



HAL
open science

Biomarqueurs cellulaires circulants dans les cancers avancés

Christophe Massard

► **To cite this version:**

Christophe Massard. Biomarqueurs cellulaires circulants dans les cancers avancés. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T087 . tel-01015618

HAL Id: tel-01015618

<https://theses.hal.science/tel-01015618>

Submitted on 26 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
PARIS
SUD

Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE
Laboratoire INSERM U981

DISCIPLINE : Biologie Cellulaire et Moléculaire

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement le 4 Décembre 2013

par

Christophe MASSARD

Né le 12 Janvier 1977, à Saint-Etienne

BIOMARQUEURS CELLULAIRES CIRCULANTS DANS LES CANCERS AVANCÉS

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Karim FIZAZI

Composition du jury :

Président du jury Monsieur le Professeur Jean-Charles SORIA

Rapporteurs : Monsieur le Professeur Stéphane CULINE

Monsieur le Professeur Jean-Yves PIERGA

Le travail que je présente dans ce mémoire a pu être effectué grâce à l'aide, les conseils et le soutien de nombreuses personnes, que je tiens à remercier.

Mes remerciements vont tout d'abord au **Pr Karim Fizazi**, qui m'a fait découvrir le cancer de la prostate et les tumeurs germinales depuis mes jeunes années de clinicat, m'a conseillé et soutenu tout au long de mon parcours, et a créé au sein de l'Institut Gustave Roussy un groupe dynamique de cancérologues des pathologies génito-urinaires. Je suis très heureux de pouvoir lui apporter ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le **Professeur Stéphane Culine** d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur. Ses remarques précises et pertinentes apportent un éclairage nouveau à ce travail. De plus, je tiens à le remercier pour le dynamisme du groupe GETUG.

Je remercie Monsieur le **Professeur Jean-Yves Pierga** d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur. La rigueur scientifique et la pertinence de ses commentaires m'ont marqué. Je tiens aussi à le remercier de tous ses efforts pour encourager et soutenir la recherche sur les cellules tumorales circulantes en France.

Je remercie Monsieur le **Professeur Jean-Charles Soria**, qui pour la seconde fois, me fait l'honneur de siéger à mon jury de thèse, et m'a soutenu pendant tout mon parcours à l'Institut Gustave Roussy. Je le remercie aussi de m'avoir introduit dans le monde des essais précoces, et je suis heureux de pouvoir continuer cette passionnante aventure, en «haute mer».

Je remercie **Monsieur le Docteur Johann de Bono**, qui m'a accueilli dans son laboratoire au Institute of Cancer Research.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres du laboratoire du Cancer Biomarker Group, et plus particulièrement Ruth Riisnaes, Susana Miranda, Jane Goodall, Anna Wingate, Ai Lim, Shahneen Sandhu, et les filles du TMO. Leur aide et leur bonne humeur ont grandement facilité mon travail. Je

tiens à remercier particulièrement le **Docteur Jeremy Clark**, dont la vivacité d'esprit et le génie pratique m'ont impressionnés.

Je tiens à remercier le Dr Françoise Farace et tous les membres de son laboratoire à l'Institut Gustave Roussy pour le travail effectué en collaboration sur le cancer de la prostate: Marianne, Amélie, Marie-Charlotte, Rachel, Fanny. Que les projets à venir soient aussi stimulants. Je remercie aussi le Dr Isabelle Borget pour sa pertinence statistique et sa bienveillance. Un grand merci aussi au Dr Philippe Vielh et à son équipe, en particulier Virginie et Françoise.

Je remercie vivement tous mes amis, et plus particulièrement Marie-Aurélie et Sébastien, Benjamin, Sylvestre, Bertrand, Olivier et Karim pour leur accueil pendant notre exil, ainsi que les Frenchies de Sutton, Elsa et Guillaume, qui nous ont fait sentir comme à la maison.

Un grand merci à toutes « mes » secrétaires qui me supportent au quotidien : Myriam, Catherine, Valérie, Audrey, Charlotte, Claire... en particulier Laurence pour l'aide apportée à mon manuscrit, et Christine notre « maman » aux enfants du 7^{ème}.

Merci aussi à Mne Maud Ngo Camus pour son énergie et sa gentillesse dans son travail : sans toi, pas de CTC !

Je remercie Laurence, Yohann et Benjamin, brillants collègues et amis : l'IGR ne serait pas le même sans vous.

A mes parents et ma p'tite sœur pour leur soutien constant.

A mes deux p'tites parisiennes, **Géraldine et Charlotte**.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	14
Partie I : Intérêt de la détection des cellules tumorales circulantes chez les patients atteints de cancers avancés.	18
I. Contexte de l'étude	
II. Objectif de l'étude	
III. Résultats	
IV. Discussion	
Partie II : Intérêt de l'étude des cellules circulantes comme facteur pronostique de la survie des patients atteints de cancers avancés inclus en phase 1	71
I. Contexte de l'étude	
II. Objectif de l'étude	
III. Résultats	
IV. Discussion	
CONCLUSION et PERSPECTIVES	107
REFERENCES	114
ANNEXES	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Exemple de différentes plateformes pour la détection des CTC (adapté de Georges/Pantel 2013)

Tableau 2 : Résumé des avantages et des limites de chaque approche pour la détection des CTC chez les patients atteints de cancer (adapté de Alix-Panabière et al, 2008 ; Krebs et al, 2012)

Tableau 3 : Taux de CTC détectées par la méthode CellSearch® et survie globale à partir d'importantes cohortes de patients atteints de cancers métastatique mammaires, colorectaux et de la prostate (Cohen et al, 2008; Cristofanilli et al, 2004; de Bono et al, 2008 ; Krebs et al, 2011).

Tableau 4 : Applications potentielles de l'analyse des cellules tumorales circulantes (CTC) : il est possible de distinguer deux grands types de perspectives pour l'étude des CTC : d'une part l'utilisation du comptage des CTC à l'aide de différentes plateformes, et d'autre part l'isolement des CTC à des fins de caractérisation (Krebs et al, 2011).

Tableau 5 : Taux de conversion du groupe défavorable (≥ 5 CTC) au groupe favorable (< 5 CTC) chez les patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration inclus dans l'étude de phase III COU-301 randomisant l'acétate d'abiraterone plus prednisone à un placebo plus prednisone (Scher et al, ASCO 2011 ; DeBono et al, 2011 ; Fizazi et al, 2011).

Tableau 6 : Thérapies moléculaires ciblées ayant démontré un bénéfice dans des populations de patients atteints de cancers avec une altération moléculaire définie (adapté de Rordon et al, 2012).

Tableau 7: Facteurs pronostiques de survie identifiés dans les principales études rétrospectives et prospectives pour les patients inclus dans les essais de phase 1 (adapté de Ploquin et al, 2011)

Tableau 8: Facteurs pronostiques et devenir des patients inclus en phase I et score du RMH (Royal Marsden Hospital) (Arkenau et al, 2008 et 2009).

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Analyse des CTC par la méthode CellSearch®

Figure 2 : Exemple de détection d'une CTC avec la méthode CellSearch®.

Figure 3: Analyse des CTC par la méthode ISET

Figure 4 : Première étape d'enrichissement des CTC basée sur les propriétés physiques ou biologiques des CTC (adapté de Alix-Panabière, Pantel et al, 2012)

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA	Acetate d'Abiraterone
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNcir	ADN circulant
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARN	Acides ribonucléiques (ARN)
ARNm	Acides ribonucléiques (ARN) messenger
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region protein
BEAMing	Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1 BRCA2	Breast cancer 1 et 2
CD45	Common leucocyte antibody
CEC	Cellules endothéliales circulantes
CEP	Cellules endothéliales progénitrices
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CK18 CK19	Cytokeratins 18 et 19
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
CTC	Cellules Tumorales Circulantes
CTCtrap	Circulating Tumor Cells TheRapeutic APheresis
CTM	Circulating tumor microemboli
DDU	Drug Development Unit
DTC	Disseminated Tumor cells
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicine Agency
EML4-ALK	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPCAM	Epithelium Cell Adhesion Molecule
ERG	ETS-related gene
ETS	Erythroblast transformation- specific
EWS-FLI	Friend leukemia integration 1 transcription factor
FDA	Food Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HCG	Hormone gonadotrophine chorionique
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor

ISET	Isolation by size of epithelial tumour cells
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH	Lactate deshydrogenase
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MOSCATO	Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization
PAL	Phosphatase alcaline
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PETRUS	Prostate cancer Evaluation of TaRgets in genito Urinary Screening program
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor Receptor
PH	chromosome Philadelphie
PHRC	Programmes hospitaliers de recherche clinique
PI3KCA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit alpha
PS	Performance status
PSA	Prostate Specific Antigen
PTCH1	Patched 1
RC	Réponse Complète
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors -
RMH	Royal Marsden Hospital
SMO	Smoothened
TGR	Tumor Growth Rate
TMC	Thérapies Moléculaires Ciblées
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TNM	tumors/nodes/metastases
VEGF	Vascular endothelial growth factor
AA	Acetate d'Abiraterone
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNcir	ADN circulant
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARN	Acides ribonucléiques (ARN)
ARNm	Acides ribonucléiques (ARN) messenger
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region protein
BEAMing	Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1 BRCA2	Breast cancer 1 et 2
CD45	Common leucocyte antibody
CEC	Cellules endothéliales circulantes
CEP	Cellules endothéliales progénitrices

CGH	Comparative Genomic Hybridization
CK18 CK19	Cytokeratins 18 et 19
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
CTC	Cellules Tumorales Circulantes
CTCtrap	Circulating Tumor Cells Therapeutic Apheresis
CTM	Circulating tumor microemboli
DDU	Drug Development Unit
DTC	Disseminated Tumor cells
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicine Agency
EML4-ALK	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPCAM	Epithelium Cell Adhesion Molecule
ERG	ETS-related gene
ETS	Erythroblast transformation- specific
EWS-FLI	Friend leukemia integration 1 transcription factor
FDA	Food Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HCG	Hormone gonadotrophine chorionique
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor
ISET	Isolation by size of epithelial tumour cells
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH	Lactate deshydrogenase
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MOSCATO	Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization
PAL	Phosphatase alcaline
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PETRUS	Prostate cancer Evaluation of Targets in genito Urinary Screening program
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor Receptor
PH	chromosome Philadelphie
PHRC	Programmes hospitaliers de recherche clinique
PI3KCA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit alpha
PS	Performance status
PSA	Prostate Specific Antigen
PTCH1	Patched 1
RC	Réponse Complète
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors -
RMH	Royal Marsden Hospital
SMO	Smoothened

TGR	Tumor Growth Rate
TMC	Thérapies Moléculaires Ciblées
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TNM	tumors/nodes/metastases
VEGF	Vascular endothelial growth factor
AA	Acetate d'Abiraterone
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNcir	ADN circulant
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARN	Acides ribonucléiques (ARN)
ARNm	Acides ribonucléiques (ARN) messenger
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region protein
BEAMing	Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1 BRCA2	Breast cancer 1 et 2
CD45	Common leucocyte antibody
CEC	Cellules endothéliales circulantes
CEP	Cellules endothéliales progénitrices
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CK18 CK19	Cytokeratins 18 et 19
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
CTC	Cellules Tumorales Circulantes
CTCtrap	Circulating Tumor Cells Therapeutic Apheresis
CTM	Circulating tumor microemboli
DDU	Drug Development Unit
DTC	Disseminated Tumor cells
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMEA	European Medicine Agency
EML4-ALK	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPCAM	Epithelium Cell Adhesion Molecule
ERG	ETS-related gene
ETS	Erythroblast transformation- specific
EWS-FLI	Friend leukemia integration 1 transcription factor
FDA	Food Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2

HCG	Hormone gonadotrophine chorionique
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor
ISET	Isolation by size of epithelial tumour cells
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH	Lactate deshydrogenase
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MOSCATO	Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization
PAL	Phosphatase alcaline
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PETRUS	Prostate cancer Evaluation of TaRgets in genito Urinary Screening program
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor Receptor
PH	chromosome Philadelphie
PHRC	Programmes hospitaliers de recherche clinique
PI3KCA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit alpha
PS	Performance status
PSA	Prostate Specific Antigen
PTCH1	Patched 1
RC	Réponse Complète
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors -
RMH	Royal Marsden Hospital
SMO	Smoothened
TGR	Tumor Growth Rate
TMC	Thérapies Moléculaires Ciblées
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TNM	tumors/nodes/metastases
VEGF	Vascular endothelial growth factor

LISTE DES PUBLICATIONS

Les travaux de thèse ont donné lieu aux publications suivantes :

- **Massard C**, Borget I, Le Deley MC, Taylor M, Gomez-Roca C, Soria JC, Farace F. Prognostic value of circulating VEGFR2+ bone marrow-derived progenitor cells in patients with advanced cancer. Eur J Cancer. 2012
- Farace F, **Massard C**, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, Laplanche A, Chauchereau A, Lacroix L, Planchard D, Le Moulec S, André F, Fizazi K, Soria JC, Vielh P. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. Br J Cancer. 2011.
- Olmos D, Baird RD, Yap TA, **Massard C**, Pope L, Sandhu SK, Attard G, Dukes J, Papadatos-Pastos D, Grainger P, Kaye SB, de Bono JS. Baseline circulating tumor cell counts significantly enhance a prognostic score for patients participating in phase I oncology trials. Clin Cancer Res. 2011

Autres publications en rapport avec le projet de thèse :

- **Massard C**, Fizazi K. Targeting continued androgen receptor signaling in prostate cancer. Clin Cancer Res. 2011.
- Demande CTC-FISH (Ref IGR&D : 11/08) : Demande de Brevet prioritaire PCT/FR2011/052688 déposé le 17 novembre 2011
- Inventeurs: Amélie Barthélémy, Françoise Farace, **Christophe Massard**, Marianne Oulhen, Alexander Valent, Philippe Vielh
- Titre: Méthode de caractérisation de cellules tumorales circulantes et application au diagnostic
- Déposant: Institut Gustave Roussy

ANNEXES

Protocole CTC et RECIST dans les essais de phase I : *Analyse de la relation entre l'évolution quantitative des Cellules Tumorales Circulantes (CTC) et la réponse RECIST chez des patients inclus dans les essais de phase I.*

Protocole PETRUS (Prostate cancer Evaluation of TaRgets in genito Urinary Screening program): *Vers un traitement personnalisé des cancers de la prostate métastatiques «précoces» basé sur l'utilisation de biomarqueurs évalués sur la tumeur ou les cellules tumorales circulantes.*

Introduction

Après plusieurs décennies au cours desquelles le traitement systémique des cancers reposait presque exclusivement sur l'emploi de la chimiothérapie cytotoxique, la prise en charge des patients atteints de cancer métastatique a été radicalement modifiée par l'avènement des thérapies moléculaires ciblées (TMC) au début du XXIème siècle. Ces nouvelles stratégies thérapeutiques ont non seulement permis d'augmenter la survie des patients atteints de cancer métastatique dans différents types tumoraux, en particulier les plus fréquents comme le cancer du sein, du poumon, de la prostate et du colon (Meyerhardt et al, 2004), mais elles ont aussi permis de proposer une nouvelle approche de la prise en charge des patients atteints d'un cancer, en intégrant les données acquises sur la biologie du cancer dans la pratique clinique, que ce soit au cours de protocoles de recherche ou dans les soins aux patients (Baselga et al, 2000 ; Artega and Baselga 2012 ; Tursz et al, 2010).

Compte tenu du nombre exponentiel de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes et des combinaisons de thérapies ciblées, mais aussi de l'attrition importante des médicaments dans le développement thérapeutique, il est devenu indispensable de développer des outils permettant de guider le développement de ces nouvelles thérapies, mais aussi d'accompagner le clinicien dans sa décision quant à la thérapeutique la plus efficace pour chacun de ses patients (Carden et al, 2010 ; Yap et al, 2012 ; Debono et al, 2010).

Mon travail de thèse s'est donc intéressé à l'étude de biomarqueurs circulants peu invasifs que sont les cellules tumorales circulantes (CTC) et les cellules endothéliales circulantes (cellules endothéliales circulantes CEC et cellules

endothéliales progénitrices CEP), avec un intérêt particulier pour des applications futures dans les domaines des essais de phase I/II dit «précoces» et dans la prise en charge des patients atteints de cancer de la prostate avancé.

La première partie de mon travail de thèse avait pour objectif de participer au développement d'une nouvelle plateforme technologique pour permettre l'isolement et la caractérisation des CTC chez des patients atteints de cancer. Dans ce travail, nous avons comparé la capacité de détection des CTC chez des patients en utilisant le système CellSearch® (Veridex, Warren, NJ, USA), et une méthode basée sur l'utilisation de filtres appelée ISET® (Isolation by size of epithelial tumour cells; Rarecells, Paris). La faisabilité, la sensibilité et la spécificité de la technique ISET® ont ainsi été étudiées pour la détection de CTC à partir du sang de patients ayant un cancer du sein, un cancer de la prostate ou un cancer bronchique avancé. Ce travail a pu montrer qu'il existe des différences entre les deux techniques de détection des CTC selon le type de cancers. De plus, ce travail souligne que l'isolement de CTC en utilisant des technologies différentes pourrait être un substitut ou un complément prometteur du tissu tumoral pour l'analyse moléculaire des tumeurs, et servir de «biopsie liquide», en particulier dans le cadre du suivi des patients traités par TMC. J'ai poursuivi cette thématique de recherche dans le laboratoire du Dr Johann de Bono à Sutton en Grande-Bretagne et mis en place un programme de caractérisation moléculaire des CTC chez les patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration métastatique.

La deuxième partie de mon travail s'est intéressée à des biomarqueurs sanguins pour le suivi des patients atteints de cancers avancés inclus dans des études de phase I/II, afin de savoir si ces outils pouvaient être des facteurs pronostiques de la survie de ces patients. Le but premier des essais de phase I est de déterminer la tolérance et le profil de toxicité d'un nouveau médicament ou d'une nouvelle stratégie thérapeutique, mais également de mettre en évidence le premier signal d'une activité anti-tumorale en clinique humaine. Il est donc important de bien définir les patients qui seront inclus dans ces études, et en particulier d'exclure des patients qui seraient à risque de décéder à court terme (mortalité à 90 jours). Dans notre travail, nous avons voulu étudier la valeur pronostique des cellules circulantes dans cette population particulière de patients inclus dans les essais de phase I. Pour ce faire, les taux des cellules endothéliales circulantes (CEC), des cellules endothéliales progénitrices (CEP) et des CTC ont été analysés par des techniques de cytométrie en flux et par le système CellSearch® (Veridex, Warren, NJ, USA), chez des patients inclus dans les essais de phase I. Nous avons ainsi pu montrer que les CEP et les CTC pourraient être des facteurs pronostiques de la survie chez ces patients participant aux études de phase I indépendamment des critères cliniques connus.

Partie I

Intérêt de la détection des cellules tumorales circulantes chez les patients atteints de cancers avancés

I. Contexte de l'étude

Les progrès continus dans la compréhension de la biologie moléculaire des cancers ont permis de réaliser au cours de ces dernières décennies de nombreuses avancées dans la classification et le traitement des cancers (Haber et al, 2011 ; DeBono et al, 2010). La grande majorité des patients décèdent d'un cancer du fait du développement de métastases (Bidard et al, 2011 ; Wittekind, C. and Neid, M et al, 2005 ; Weiss et al, 2000), ce qui explique l'intérêt suscité par la compréhension des mécanismes moléculaires du processus métastatique et la nécessité de développer des biomarqueurs pour suivre l'évolution de ce processus chez les patients (Sahai et al, 2007 ; Pantel et al, 2008 ; Morcelli et al, 2006).

Au cours du processus métastatique, les cellules tumorales circulent dans le sang pour aller coloniser d'autres organes à distance (Hanahan et al, 2001 ; Hanahan et al, 2011 ; Chambers et al, 2002). Cette hypothèse avait été soulevée pour la première fois au XIX^{ème} siècle par le pathologiste australien Thomas Ashworth, et a été ensuite validée (Ashworth, 1869). Plusieurs événements biologiques au cours de la cascade métastatique peuvent influencer le nombre de cellules tumorales circulantes (CTC) chez un patient donné (Chambers et al, 2002). Ainsi, la mesure directe dans le sang de cellules tumorales a été proposée comme un outil permettant d'appréhender le processus métastatique mais aussi comme un nouveau biomarqueur potentiellement utile afin de guider individuellement le traitement (Diel et al, 1996 ; Pantel et al, 1996 ; Pantel k et al, 2008). La première démonstration est

venue de la prise en charge des hémopathies malignes car il est relativement simple d'isoler et d'étudier les cellules leucémiques circulant dans le sang afin d'établir un diagnostic ou de suivre le traitement. L'exemple de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est emblématique : la LMC est une maladie rare (1/100000), dont le clone leucémique est issue d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente avec une prolifération à prédominance myéloïde monoclonale (Drucker BJ et al, 2003 ; Rousselot et al, 2012). Elle est caractérisée par un marqueur chromosomique spécifique des cellules leucémiques : le chromosome Philadelphie (Ph), qui résulte d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9(q34) et 22(q11) induisant un réarrangement de deux gènes cellulaires ubiquitaires BCR et ABL en un gène de fusion fonctionnel BCR-ABL, traduit en une protéine à activité tyrosine kinase, acteur central de la transformation maligne. La prise en charge et l'histoire naturelle de ce syndrome myéloprolifératif ont été révolutionnées par l'imatinib qui cible la protéine issue du gène de fusion BCR-ABL (Druker et al, 1996 ; Druker et al, 2001). Avant 2000, la LMC évoluait classiquement en trois phases: après une phase chronique ou stable de 3 à 5 ans environ, les malades présentaient une phase accélérée (12-18 mois) puis une crise blastique à partir de laquelle la médiane de vie n'était que de trois mois. Après l'apparition de imatinib (et maintenant d'autres TMC), la LMC est devenue une maladie chronique avec peu d'événements de progression vers la phase blastique, et des survies très prolongées sont maintenant décrites. De plus, il est possible de suivre la réponse au traitement par imatinib en détectant le transcrite de fusion chez les patients : l'évaluation de la réponse moléculaire se base sur la quantification du transcrite BCR-ABL par PCR dont les techniques

ont été standardisées (exprimé en ratio %), permettant de définir une réponse moléculaire majeure (ratio à 0,1%) et une réponse complète (absence de signal détectable, ratio<0,001%). Il a été montré que la réponse moléculaire majeure est un facteur pronostique plus puissant que la réponse cytogénétique (Baccarani et al, 2013). Ainsi, l'exemple de la LMC illustre parfaitement la révolution nosologique et thérapeutique introduite avec les TMC et l'intérêt du suivi des patients atteints de pathologies malignes à l'aide de biomarqueurs non invasifs circulants.

A l'inverse du domaine des hémopathies malignes, l'étude des CTC ou d'autres cellules circulantes en rapport avec la biologie tumorale chez les patients atteints d'une tumeur solide a été longtemps difficile du fait des problèmes technologiques pour isoler les CTC (Morcellin et al, 2006 ; Pantel et al, 2009; Zach et al, 2006). Ce n'est qu'à partir de la fin des années 1990 que plusieurs équipes de recherche ont montré qu'il était possible d'enrichir, de détecter et de compter les CTC à partir de prélèvements sanguins de patients atteints de cancers épithéliaux avancés. Les différentes plateformes technologiques utilisent des propriétés physiques ou biologiques qui permettent de distinguer les CTC des cellules hématologiques normales dans un prélèvement sanguin. Il a été ainsi montré que les CTC étaient détectées de façon commune chez des patients atteints de différents types de tumeurs malignes épithéliales ou non épithéliales, à la différence des personnes volontaires saines ou des patients atteints de pathologies bénignes (Soria et al, 1999; Allard et al, 2004 ; Fizazi et al, 2007 ; Pierga et al, 2012 ; Alix Panabiere et al, 2007 ; Pantel et al, 2009). La détection et la caractérisation des CTC ouvrent la voie à de multiples

perspectives, devenant un enjeu majeur dans le domaine de la recherche translationnelle: évaluation du pronostic des patients, suivi de la réponse à un traitement. Par ailleurs, l'isolement des CTC chez un patient donné est une occasion unique d'avoir accès à une source de matériel tumorale d'une façon peu invasive ce qui ouvre des perspectives très intéressantes pour une caractérisation morphologique, phénotypique et moléculaire de ces cellules.

II. Objectif de l'étude

L'hypothèse première de ce travail était de comparer deux méthodes d'isolement et de détection des CTC chez des patients atteints de cancers avancés métastatiques d'origine épithéliale.

Notre étude avait pour but de comparer le nombre de CTC isolées par la méthode CellSearch® (Veridex, Warren, NJ, USA) au nombre de CTC isolées par une technique de filtration appelée ISET® (Isolation by size of epithelial tumour cells; Rarecells, Paris) (Paterlini Brechot 2007).

La technologie Veridex CellSearch® est un système semi-automatique basé sur la microscopie à fluorescence et une technique de sélection des CTC utilisant des billes magnétiques marquées par des anticorps spécifiques des cellules épithéliales (anti-CK8, anti-CK18 et anti-CK19), anti-leucocytes (anti-CD45) et un marquage nucléaire (DAPI). L'étape finale de sélection du phénotype (EpCAM positif, cytokératine positif, DAPI positif et CD45 négatif) correspondant aux CTC est réalisée par un technicien. En pratique, le sang des patients est collecté dans des tubes dédiés de type CellSave® Blood Collection tubes (Veridex, Raritan, NJ, USA) contenant de l'EDTA et un conservateur cellulaire. Ces tubes permettent une conservation optimale des échantillons, à température ambiante, jusqu'à 96 heures après le prélèvement, rendant possible la reproductibilité et la fiabilité des analyses. La technique commence par une étape de capture des CTC avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques des cellules épithéliales (anti-EpCAM) suivie d'une

étape de marquage avec des anticorps anti-cytokératines (CK8, CK18 & CK19), anti-CD45 (marqueur leucocytaire) et un marquage nucléaire (DAPI) (Figure 3). Par la suite, la préparation est insérée dans une cellule de lecture qui va scanner automatiquement les cellules marquées retenues sur les billes aimantées. L'opérateur valide ensuite l'identité des cellules triées qui doivent être positives pour les antigènes épithéliaux et négatives pour les antigènes leucocytaires (Figure 1 et 2). Cette plateforme technique semi-automatique a pu être validée dans plusieurs grandes cohortes de patients atteints de cancers d'origine épithéliale compte tenu d'une certaine facilité d'utilisation, de robustesse et de reproductibilité des résultats (Kraan et al, 2011). Cette méthode est actuellement la seule méthode de détection des CTC présentant un niveau de standardisation compatible avec des études multicentriques et/ou avec une application en routine clinique.

Figure 1: Analyse des Cellules Tumorales Circulantes par la méthode CellSearch®.

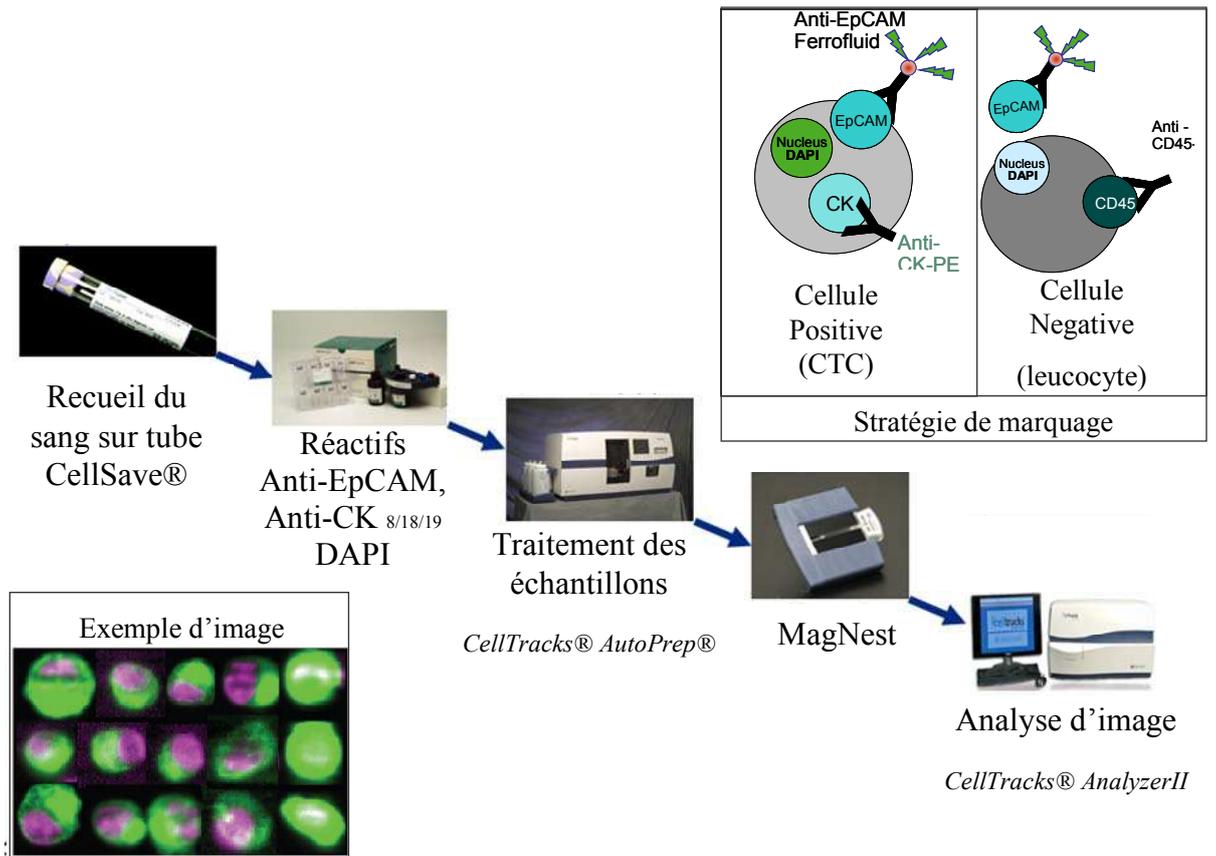


Figure 2 : exemple d'une CTC isolé et détecté en CellSearch®.

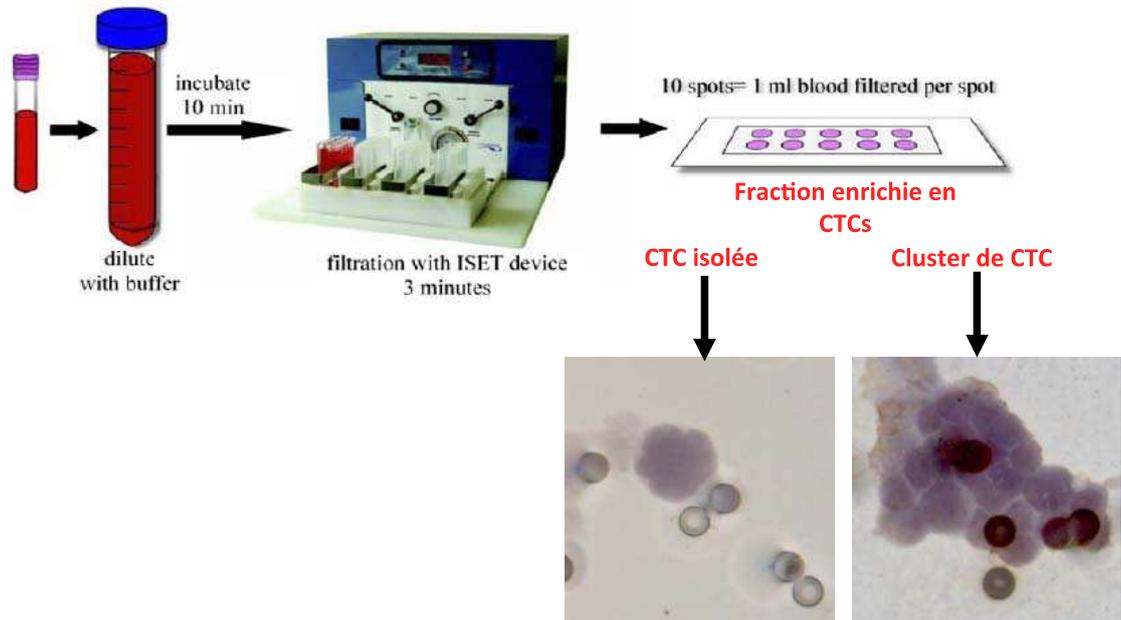
Méthode de détection	Avantages	Limites
CellSearch®	<ul style="list-style-type: none"> Robustesse Reproductible Semi-automatisée Analyse morphologique des CTC Analyse phénotypique avec plusieurs anticorps Quantification directe Isolement des CTC pour des analyses moléculaires 	<ul style="list-style-type: none"> Analyse subjective de la détection des CTC Limites des analyses possibles

Le système ISET® (Isolation by size of epithelial tumour cells; Rarecells, Paris) est une technique d'isolement des CTC basée sur la filtration des cellules (Paterlini-Brechot et al, 2007 ; Hofman et al, 2011a et 2011b). Cette technique est disponible à l'Institut Gustave Roussy depuis Octobre 2007 dans le Laboratoire de Recherche Translationnelle (Dr F Farace). Le système ISET® est indépendant de l'expression des marqueurs épithéliaux et permet d'isoler des CTC épithéliales ou non épithéliales avec une sensibilité de 1 CTC par millilitre de sang. Les cellules isolées sur le filtre peuvent être marquées directement pour des analyses cytologiques, d'immunohistochimie, ou par FISH. La technique ISET® nécessite un prélèvement de sang de 10 ml par filtre pour la filtration, en présence d'une solution ISET Buffer préalablement préparé. Le sang dilué est incubé pendant 10 min à température ambiante, avec homogénéisation des tubes toutes les 2 min. La filtration utilise une pompe calibrée, et un système appelé l'ISET Block® dont les puits sont remplis avec le sang dilué. Le filtre est ensuite séché, puis il faut décoller délicatement la membrane présente à l'arrière du filtre, qui peuvent être gardés à -20°.

Afin d'évaluer si le type de CTC détectées est influencé par des caractéristiques inhérentes aux patients ou aux types de cancers, nous avons déterminé le taux de CTC par ces deux méthodes dans trois cohortes de patients atteints de cancer du sein, de la prostate et des bronches.

Figure 3: Analyse des Cellules Tumorales Circulantes par la méthode ISET®.

CTC : Enrichissement par ISET



Méthode de détection	Avantages	Limites
ISET® (Isolation by size of epithelial tumour cells; Rarecells, Paris)	<ul style="list-style-type: none"> Tous types de cancers Analyse morphologique des CTC Analyse phénotypique avec plusieurs anticorps Quantification directe Isolement des CTC pour des analyses moléculaires 	<ul style="list-style-type: none"> Durée de la préparation et de l'analyse Dépendance de l'opérateur Difficulté des études multicentriques

III. Résultats

Les résultats de ce travail ont été publiés en 2011 dans le British Journal of Cancer (2^{ème} auteur). L'article est reproduit ci-dessous.

Ce travail a permis de mettre en évidence que les deux méthodes d'isolement et de détection des CTC sont complémentaires, et qu'il existe clairement des différences dans le nombre des CTC identifiées en utilisant la technique CellSearch® et la technique ISET® chez les mêmes patients atteints de cancers d'origine épithéliale avancés.

Notre étude a montré qu'il existe une corrélation correcte, quoique imparfaite, entre le taux de CTC isolées par les deux techniques chez les patients atteints de cancers du sein ou de la prostate avancés (taux de concordance de 55% et 60%). En revanche, il existe une discordance importante dans le nombre de CTC détectées chez des patients atteints de cancer bronchique avancé (taux de concordance de seulement 20%), avec un nombre plus important de CTC isolées avec la technique ISET® par rapport à la technique CellSearch®.

Ces résultats suggèrent que même si la technique CellSearch® est considérée comme la technique de référence pour l'étude des CTC pour les cancers d'origine épithéliale, il paraît important de développer des technologies alternatives d'isolement des CTC.

A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas

F Farace^{*,1,2}, C Massard³, N Vimond¹, F Drusch¹, N Jacques¹, F Billiot¹, A Laplanche⁴, A Chachereau², L Lacroix^{1,2}, D Planchard³, S Le Moulec⁵, F André^{2,3}, K Fizazi^{2,3}, JC Soria^{2,3} and P Vielh^{1,6}

¹Translational Research Laboratory, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; ²University of Paris-Sud, INSERM U 981 'Identification of molecular predictors and new targets for cancer treatment', Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; ³Department of Medicine, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; ⁴Department of Biostatistics, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; ⁵Department of Oncology, Hôpital d'Instruction des Armées du Val de Grace, 75230 Paris, France; ⁶Department of Biopathology, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

BACKGROUND: Circulating tumour cells (CTCs) can provide information on patient prognosis and treatment efficacy. However, there is no universal method to detect CTC currently available. Here, we compared the performance of two CTC detection systems based on the expression of the EpCAM antigen (CellSearch assay) or on cell size (ISET assay).

METHODS: Circulating tumour cells were enumerated in 60 patients with metastatic carcinomas of breast, prostate and lung origins using CellSearch according to the manufacturer's protocol and ISET by studying cytomorphology and immunolabelling with anti-cytokeratin or lineage-specific antibodies.

RESULTS: Concordant results were obtained in 55% (11 out of 20) of the patients with breast cancer, in 60% (12 out of 20) of the patients with prostate cancer and in only 20% (4 out of 20) of lung cancer patients.

CONCLUSION: Our results highlight important discrepancies between the numbers of CTC enumerated by both techniques. These differences depend mostly on the tumour type. These results suggest that technologies limiting CTC capture to EpCAM-positive cells, may present important limitations, especially in patients with metastatic lung carcinoma.

British Journal of Cancer (2011) **105**, 847–853. doi:10.1038/bjc.2011.294 www.bjcancer.com

Published online 9 August 2011

© 2011 Cancer Research UK

Keywords: circulating tumour cell; breast cancer; prostate cancer; lung cancer; CellSearch; ISET

Metastatic dissemination of malignant solid tumours is the main cause of death by cancer in the developed countries. The metastatic cascade is defined as a series of biological events that cancer cells from the primary neoplasia must complete to develop a new malignancy at a distant site, including the crucial step consisting in the release and survival of tumour cells in the peripheral blood (Sahai, 2007). These circulating tumour cells (CTCs) consist in a heterogeneous population of very rare cells native of either the primary tumour or its own metastasis (Mocellin *et al*, 2006; Sahai, 2007; Alix-Panabières *et al*, 2008). Key molecular events involved in metastatic progression are likely to have considerable effects on the number and on the phenotype of CTC. In this regard, experimental data suggest that biological processes such as the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), associated with the acquisition of cancer stem cell properties and resistance to conventional therapy, might have a role in the generation of more aggressive sub-populations of CTC (Polyak and Weinberg, 2009; Mego *et al*, 2010). Although the existence of CTC has been known for over a hundred of years, only the recent advent of novel cytometric (i.e., whole cell based) technologies have enabled significant progress in detecting and quantifying

these cells. Using the CellSearch platform (Veridex, Warren, NJ, USA), several groups have shown an association between the counts of CTC identified by the assay and patients' clinical outcome (Cristofanilli *et al*, 2004; Cohen *et al*, 2008; De Bono *et al*, 2008). Circulating tumour cell levels were indeed prospectively demonstrated to be an independent prognostic factor in patients with advanced breast, prostate and colorectal cancers treated by conventional and/or hormonal therapy (Cristofanilli *et al*, 2004; Cohen *et al*, 2008; De Bono *et al*, 2008). Moreover, longitudinal monitoring also indicated a potential role for enumerating CTC as an endpoint biomarker making it possible to predict, at an early stage, whether a patient benefits or not from anticancer treatment (Hayes *et al*, 2006). In addition to prognostic and predictive utility, CTC also represent a unique non-invasive source of tumour material susceptible to provide real-time information on the patient's current disease status. New possibilities with important clinical implications therefore concern the molecular characterisation of CTC since it could be incorporated in future clinical designs to monitor the efficacy of or resistance to targeted therapy.

Numerous technical efforts have been made to reliably detect and quantify CTC, but the development of a universal assay has proven quite difficult. Circulating tumour cells are indeed very rare events, occurring at rates as low as one cell per 10^6 or 10^7 leukocytes and most methods rely on the combination of two steps, that is, enrichment followed by detection to increase the

*Correspondence: Dr F Farace; E-mail: farace@igr.fr
Received 23 March 2011; revised 10 June 2011; accepted 11 July 2011;
published online 9 August 2011

sensitivity of the assay (Mostert *et al.*, 2009). Another major technical challenge concerns tumour heterogeneity. Gene-expression profiling has highlighted the remarkable heterogeneity of malignant cells not only within a given histological subtype but also among tumour cells of any given patient. In addition to genetic instability inherent to most neoplastic cell types, emerging data suggest that cell-biological changes during metastatic progression, such as the transition between epithelial-to-mesenchymal states, can also generate distinct multiple cellular sub-populations contributing to intratumoural heterogeneity (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery *et al.*, 2009; Mego *et al.*, 2010). Owing to this heterogeneity, the assay used for CTC detection could strongly impact on the biomarker value of CTC, and data regarding CTC should therefore be interpreted in the context of this method.

A rather limited number of studies comparing the performance of different assays and providing data to support the choice of a given method have been published (Lambrechts *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000; Ring *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2010). This study was designed to directly compare the performance of two cytometric (i.e., CellSearch and ISET) systems based on different CTC properties, namely the expression of an epithelial antigen membrane *vs* cell size. The standardised and semi-automated CellSearch platform is the only assay currently approved by the Food and Drug Administration. Circulating tumour cell enrichment by CellSearch is based on the expression of the epithelial-lineage marker EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). EpCAM-positive cells are enriched by immunomagnetic separation using EpCAM-specific antibodies conjugated to magnetic particles and then stained with fluorescent anti-cytokeratin and 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI), while hematopoietic cells are stained with anti-CD45 antibodies. Cytokeratin and DAPI-positive, and CD45-negative CTC are finally counted by using a semi-automated fluorescent microscope (Cristofanilli *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2008; De Bono *et al.*, 2008). ISET (isolation by size of epithelial tumour cells) makes it possible to collect tumour cells based on their larger size as cells are enriched by blood filtration through filtering membranes with calibrated pores 8 μ m in diameter (Vona *et al.*, 2000, 2004; Paterlini-Brechot and Benali, 2007). Enriched cells are stained on the filter for cytomorphological examination or further characterised by immunocytochemistry. As the performance of CTC detection assays may also be influenced by intrinsic characteristics of different tumour types, this study comprises 60 patients with metastatic carcinomas of breast, prostate and lung origins.

PATIENTS AND METHODS

Blood sample collection

This study was approved by our institutional review board and local ethics committee. Informed and written consent was obtained from all patients. Peripheral blood samples were collected from 60 patients with histologically or cytologically confirmed metastatic breast ($n=20$), prostate ($n=20$) or non-small cell lung cancer ($n=20$). Clinico-pathologic information was recorded for all patients. For each patient, 10 ml of blood was collected in EDTA tubes (Terumo, Leuven, Belgium) for CTC enumeration by ISET and 7.5 ml was collected in CellSave collection tubes (Immunicon Inc., Huntingdon Valley, PA, USA) for the CellSearch test.

Enumeration of CTC by CellSearch

Circulating tumour cell enumeration using the CellSearch system (Veridex LLC, Raritan, NJ, USA) was carried out according to the manufacturer's protocol and training. Blood samples were processed on the CellTracks Autoprep within 72 h. Epithelial cells were immunomagnetically enriched using ferrofluids coated with

EpCAM-specific antibodies, then permeabilised and fluorescently labelled with phycoerythrin-conjugated antibodies directed against cytokeratin 8, 18 and 19, an allophycocyanin-conjugated antibody to CD45 and the nuclear dye DAPI. After transfer to a cartridge in a MagNest, labelled cells were analysed on the CellTracks Analyser II, a four-colour semi-automated fluorescent microscope that captures images of the entire surface of the cartridge for the four fluorescent dyes. From the captured images, a gallery of objects was presented to a trained operator (technician) who interprets each object. According to manufacturer guidelines, an object defined as a CTC should meet all of the following criteria: (i) an intact cell with a round to oval morphology and at least 4 μ m in size; (ii) positive for DAPI with a nucleus inside the cytoplasm (of at least >50%) and a nucleus area smaller than the cytoplasm; (iii) positive for cytokeratins (bright or moderate) and negative for CD45 and the blank channel. Each sample was analysed independently by two trained technicians (NV and NJ).

Enumeration of CTC by ISET

ISET was carried out as previously reported (Vona *et al.*, 2000, 2004; Paterlini-Brechot and Benali, 2007). Blood samples (10 ml) were processed within 4 h, diluted 1:10 in an erythrocyte-lysis buffer and filtered on the ISET device. The module filtration had a membrane of 10 wells making it possible to process blood samples of 10 ml (i.e., 100 ml of diluted blood). After filtration, membranes were washed with PBS, disassembled from the filtration module, allowed to air-dry overnight and stored at -20°C until staining. Before staining, membranes were thawed, hydrated in TBS (Dako, Glostrup, Denmark), and treated at 98°C in EDTA pH: 9.9, for 20 min, for antigenic retrieval. After being rinsed in TBS and dried at room temperature, membranes were permeabilised 5 min in the presence of TBS containing 0.2% Triton X100 (Roche, Mannheim, Germany) and incubated in methanol containing 3% H_2O_2 to block endogenous peroxidase. Membranes of patients with breast or lung cancer were incubated overnight at 4°C in wet chambers, with an antibody raised against cytokeratin 7 (Dako), a keratin usually expressed in both malignant breast and lung tumours whereas those of patients with prostate cancer were stained with an anti-p504S antibody (Dako) directed to alpha-methylacyl coenzyme A racemase, a marker specifically and highly expressed in prostate adenocarcinoma. After rinsing in TBS, membranes were incubated with a secondary antibody labelled with peroxidase (Dako) for 45 min at room temperature. Finally, membranes were rinsed again in TBS, treated with diaminobenzidine (Dako) for 10 min and counterstained. Each immunostaining experiment included positive (a positive cell line stained with the specific antibody) and negative (the positive cell line stained with a nonspecific antibody of the same isotype and at the same concentration than the specific antibody) controls. Stained membranes were examined by a trained technician using light microscopy in two steps: (i) screening at $\times 20$ magnification to locate cells, (ii) observation at $\times 63$ magnification with oil immersion for detailed cytomorphological analysis. Isolated and/or clusters of cells of interest (immunostained or not) were selected, digitised, and examined by an experienced cytopathologist (PV). Circulating tumour cells were defined as cells presenting all the following criteria: (i) nuclear size equal or larger than two pores (i.e., equal or larger than 16 μm); (ii) irregularity of the nuclear contour; (iii) presence of a visible cytoplasm; and (iv) high nuclear-to-cytoplasmic ratio (>0.8). When one or several of the above criteria were missing, cells were classified as atypical. Samples of 10 ml were usually processed on ISET, and calculations were made in order to express CTC in 7.5 ml.

Statistical methods

As CTC levels in patients were not normally distributed, results were presented as counts and medians with the corresponding

percentages and ranges. Linear regression plots were computed for CTC counts obtained by the CellSearch and ISET techniques. As a result of the low number of patients and of CTC count distribution, CTC values determined using both CellSearch and ISET technique were correlated by the Spearman test.

RESULTS

Each of the 60 patients with metastatic breast (MBC), prostate (MPC) and lung (MLC) carcinomas had blood collected for CTC

enumeration by both the CellSearch and ISET techniques. Tables 1, 2 and 3 respectively show the clinico-pathological characteristics of the patients with MBC (n = 20), MPC (n = 20) and MLC (n = 20), as well as their respective CTC counts obtained by both techniques. Representative examples of isolated CTC (panels A and B) and of a CTC cluster (panel C) detected by ISET are shown in Figure 1.

The median CTC count was of 2 CTC/7.5 ml for both techniques (range, 0–25 500 for CellSearch, range, 0–20 for ISET) in MBC patients. Circulating tumour cell counts for the two methods obtained were weakly correlated (r = 0.46, P = 0.04) (Figure 2A). Of the 20 patients with MBC, eight (40%) had CTC counts equivalent

Table 1 Clinico-pathological characteristics of patients with metastatic breast cancer with their respective CTC counts

Patients ^a	Age ^b	Histology	ER/PR/HER2 status	TNM stage	ISET		CellSearch
					CTC/7.5 ml	Atypical cells/7.5 ml	CTC/7.5 ml
B1	56	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	T2N0M0	6	25	14
B2	49	IDC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	T3N1M0	4	14	200
B3	56	ILC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	T3N2M0	20	165	25 500
B4	39	IDC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	TxNxM1	1	4	2
B5	36	IDC ^c	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺	T3N2M0	3	6	19
B6	61	IDC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁺	T4dN2Mx	1	0	2
B7	49	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺	T4dN1M0	1	1	1078
B8	70	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺	T2N1M0	0	1	1
B9	43	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺	T2NxM1	2	2	1
B10	68	IDC	ER ⁺ HER2 ⁺	TxNxM0	1	7	1
B11	38	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	T2N0M0	0	2	0
B12	68	IDC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	T1cN1M0	1	12	1
B13	43	IDC ^d	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁺	T2N0Mx	1	5	2
B14	49	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	T2N0M0	4	17	0
B15	76	IDC	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	T4dN0M0	2	18	0
B16	61	IDC	ER ⁺ PR ⁻ HER2 ⁻	T2N0Mx	9	13	13
B17	61	IDC	ER ⁺ PR ⁺	T2N1M0	5	13	0
B18	56	IDC	ER ⁺	T2N1M0	4	25	7
B19	72	IDC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	T4bN1M1	11	26	5
B20	41	IDC	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	T3N1M0	0	2	0

Abbreviations: CTC = circulating tumour cell; ER = oestrogen receptor; F = female; HER2 = human epidermal growth factor receptor 2; IDC = infiltrative ductal carcinoma; ILC = infiltrative lobular carcinoma; PR = progesterone receptor; TNM = tumour node metastasis. ^aAll patients were female. ^bAge (years) at the moment of CTC analysis. ^cInfiltrative mucinous carcinoma. ^dInfiltrative apocrine carcinoma. For patients B10, B17 and B18, PR, HER2 and PR and HER2 were not available, respectively.

Table 2 Clinico-pathological characteristics of patients with metastatic prostate cancer with their respective CTC counts

Patients	Age ^a	Histology	Gleason grade	TNM stage	PSA (μg l ⁻¹) ^b	ISET		CellSearch
						CTC/7.5 ml	Atypical cells/7.5 ml	CTC/7.5 ml
P1	80	IA	8	T2N0M1	196	12	5	8
P2	61	IA	6	T2N0M1	14.6	2	5	1
P3	75	IA	7	T3N0M1	1095	248	0	90
P4	66	IA	ND	T2N0M1	1394	30	120	643
P5	73	IA	9	T2N0M1	603	4	35	1
P6	73	IA	9	T2N0M1	60	12	55	2
P7	82	IA	8	T3N0M1	97	4	13	0
P8	62	IA	7	T3N0M1	2669	1	18	16 121
P9	70	IA	8	T2N1M1	68	25	16	11
P10	78	IA	8	T2N0M0	354	20	59	17
P11	88	IA	8	T3N0M1	77	30	30	18
P12	50	IA	9	T1N0M0	101	6	18	8
P13	50	IA	9	T3N0M1	93	35	18	5
P14	67	IA	7	T2N0M1	1.8	16	15	2
P15	67	IA	9	T3dN0M1	3.8	2	9	0
P16	83	IA	7	T2N0M1	689	14	43	278
P17	78	IA	10	T4N0M1	50	19	24	1
P18	82	IA	9	T2N0M1	85	25	43	95
P19	68	IA	9	T3N2M0	0.2	18	68	4
P20	80	IA	8	T3N1M0	40	50	185	36

Abbreviations: CTC = circulating tumour cell; IA = infiltrative adenocarcinoma; ND = not determined; PSA = prostate serum antigen; TNM = tumour node metastasis. ^aAge (years) at the moment of CTC analysis. ^bPSA at the moment of CTC analysis.

Table 3 Clinico-pathological characteristics of patients with metastatic lung cancer with their respective CTC counts

Patients	Age ^a	Sex	Histology	TNM stage	ISET		CellSearch
					CTC/7.5 ml	Atypical cells/7.5 ml	C/7.5 ml
L1	61	M	IA ^b	pT2N0M1	23	7	1
L2	63	F	SC	pT2N2M1	20	28	3
L3	38	F	EC	pT3N3M1	12	3	1
L4	56	F	IA	T3N3M1	3	4	2
L5	59	M	IA	T4N3M1	5	9	5
L6	56	M	IA	T3N2M1	2	2	0
L7	55	F	IA ^b	T2N3M1	> 100	0	13 500
L8	72	M	NE	pT3N0M1	16	10	0
L9	67	F	IA	pT2N2M1	5	22	1
L10	60	M	IA	T3N3M1	2	2	0
L11	60	M	IA	T2N2M1	14	7	46
L12	51	F	IA	pT2N0M1	2	2	0
L13	56	M	IA	T2N2M1	1	7	0
L14	61	F	IA	pT2N0M1	2	9	0
L15	38	M	IA	T4N2M1	1	2	0
L16	54	M	EC	pT4N2M1	1	0	0
L17	51	F	IA	T2N2M1	17	28	1
L18	61	M	IA	T2N2M1	12	53	0
L19	42	M	IA ^c	T2N0M1	6	5	0
L20	54	F	IA	pT2N2M0	7	46	0

Abbreviations: CTC = circulating tumour cell; EC = infiltrative epidemoid carcinoma; F = female; IA = infiltrative adenocarcinoma; M = male; NE = large cell neuroendocrine carcinoma; SC = sarcomatoid carcinoma with giant cells; TNM = tumour node metastasis. ^aAge (years) at the moment of CTC analysis. ^bPoorly differentiated. ^cBronchoalveolar.

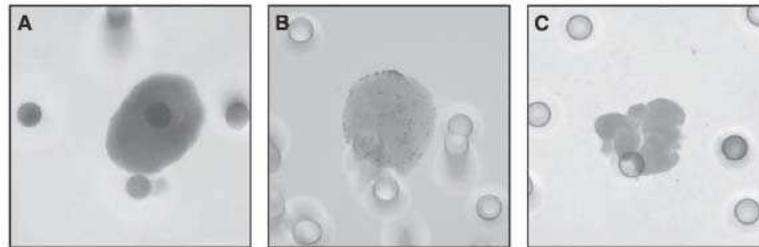


Figure 1 Microscopic analysis of CTC by ISET. (A–C) Examples of isolated CTC (A, B) and of a cluster of CTC (C) detected in a patient with metastatic prostate adenocarcinoma. Circulating tumour cells were enriched using the ISET device and stained with the anti-p504S monoclonal antibody. Circulating tumour cells were identified according to the following cytomorphological criteria: (i) nuclear size equal to or larger than two pores (i.e. equal to or larger than $16 \mu\text{m}$); (ii) the irregularity of the nuclear contour; (iii) the presence of a visible cytoplasm; (iv) a high nuclear-to-cytoplasmic ratio (> 0.8). The $8 \mu\text{m}$ width pores are visible on (A–C).

or superior to 5/7.5 ml by CellSearch while five (20%) had CTC counts $\geq 5/7.5$ ml by ISET (Table 1). Among the five negative patients using CellSearch, three were found positive by ISET, whereas of the three patients negative using ISET, one patient was found positive by CellSearch. Only two (10%) patients were negative using both techniques while discordant findings were obtained in four (15%) patients (Figure 2A). In patients with CTC detectable by both techniques, CTC counts were generally higher using CellSearch than by ISET. To further examine the concordance of both techniques, patients were classified according to the numbers of CTC detected by each technique: (i) patients with no detectable CTC (group 1); (ii) patients with CTC levels ranging from 1 to 4 CTC/7.5 ml (group 2); and (iii) patients with CTC levels equal or superior to 5 CTC/7.5 ml (group 3). Data are shown in Figure 3A. Eleven patients were found in the same group indicating a good concordance between both techniques in approximately half of the patients. In contrast, six patients had higher CTC counts using CellSearch than by ISET, while three patients had CTC counts higher using ISET than by CellSearch. Of the five patients with triple-negative breast cancer for ER, PR and HER2, a

phenotype that has been reported to express cancer-stem cell and mesenchymal markers, and exhibit a more aggressive phenotype possibly associated with the EMT process and the downregulation of epithelial markers (Sarrió *et al*, 2008; Qi *et al*, 2010), two patients (B1, B5) had higher CTC counts using CellSearch than those obtained by ISET. Therefore, in contrast to a recent report using tumour cell lines spiked in normal blood samples (Siewerts *et al*, 2009), our study suggests that the capacity of the CellSearch system does not fail to detect CTCs in such patients.

In MPC patients, the median CTC count was of 8 CTC/7.5 ml (range, 0–1621) for CellSearch and 17 CTC/7.5 ml (range, 1–248) for ISET. Circulating tumour cell counts for the two methods were again weakly correlated ($r = 0.46$, $P = 0.04$) (Figure 2B). Of the 20 MPC patients, 12 (60%) had CTC counts $\geq 5/7.5$ ml according to CellSearch while 15 (75%) had CTC counts $\geq 5/7.5$ ml using ISET (Table 2). All patients had detectable CTC by ISET while two patients were negative by CellSearch (P7 and P15 with 4 and 2 CTC/7.5 ml by ISET, respectively) (Table 2, Figure 2B). According to the classification already depicted, Figure 3B shows that 13

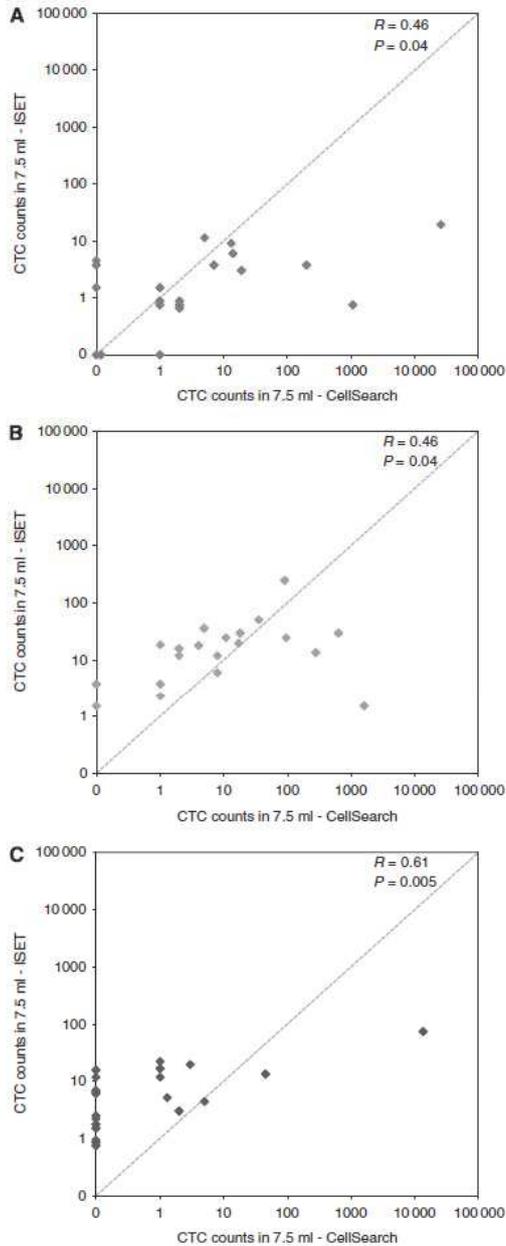


Figure 2 Circulating tumour cells counts by CellSearch and ISET in patients with metastatic carcinomas of breast (MBC), prostate (MPC) and of lung (MLC) origin. **(A)** Circulating tumour cell counts by CellSearch and ISET in patients with MBC. **(B)** Circulating tumour cell counts by CellSearch and ISET in patients with MPC. **(C)** Circulating tumour cell counts by CellSearch and ISET in patients with MLC.

A

		CellSearch		
		1	2	3
ISET	1	B11, B20	B6, B8	
	2	B14, B15	B4, B9, B10 B12, B13	B2, B5, B7 B18
	3	B17		B1, B3, B16 B9

B

		CellSearch		
		1	2	3
ISET	1			
	2	P7, P15	P2, P5	P8
	3		P6, P14, P17 P19	P1, P3, P4 P9, P10, P11 P12, P13, P16 P18, P20

C

		CellSearch		
		1	2	3
ISET	1			
	2	L6, L10, L12 L13, L14 L15, L16	L4	
	3	L8, L18 L19, L20	L1, L2, L3 L9, L17	L5, L7, L11

Figure 3 Classification of patients according to the numbers of CTC detected by CellSearch and ISET. **(A)** Classification of MBC patients according to the numbers of CTC detected by CellSearch and ISET. **(B)** Classification of MPC patients according to the numbers of CTC detected by CellSearch and ISET. **(C)** Classification of MLC patients according to the numbers of CTC detected by CellSearch and ISET. For each technique, patients with no detectable CTC were classified in group 1, patients with CTC levels ranging from 1 to 4 CTC/7.5 ml were classified in group 2 and patients with CTC levels equal or superior to 5 CTC/7.5 ml were classified in group 3.

patients were classified in the same group indicating that concordant results were observed in 60% of the patients. Furthermore, six patients (30%) had CTC counts markedly higher according to ISET than CellSearch. Only one patient (P8) had 1 CTC/7.5 ml using ISET and 1621 CTC/7.5 ml according to CellSearch. No relationship was observed between clinico-pathological characteristics of these patients and their respective counts of CTC measured by each technique.

The median CTC count was of 0 CTC/7.5 ml (range, 0–13 500) for CellSearch and 5 CTC/7.5 ml (range, 1–100) for ISET in MLC patients. Circulating tumour cell counts obtained with both methods were moderately correlated ($r=0.61$, $P=0.005$) (Figure 2C). Of the 20 patients with MLC, 3 (15%) had CTC counts $\geq 5/7.5$ ml according to CellSearch, while 12 (60%) had CTC counts $\geq 5/7.5$ ml using ISET (Table 3). Eleven (55%) patients were negative according to CellSearch, while all patients were positive using ISET. Figure 3C shows that concordant results were obtained in only 4 patients (20%) while 16 (80%) patients had CTC counts markedly higher with ISET than CellSearch. In particular, four patients had CTC counts $\geq 5/7.5$ ml according to ISET and were negative using CellSearch. In one patient (L11), CTC counts were higher with CellSearch than with ISET (46 vs 14 CTCs/7.5 ml).

DISCUSSION

Our prospective and comparative study of 60 patients with metastatic carcinoma demonstrates quite considerable discrepancies between the number of CTC enumerated by the CellSearch and the ISET systems. In all, 30% of patients (18 out of 60) were negative according to CellSearch while only 5% (3 out of 60) were negative using ISET. Concordant results only concern 28 of 60 patients (47%), whereas discordant results consist of patients with CTC counts higher according to ISET (25 out of 60; 42%) or with CTC counts higher using CellSearch (7 out of 60; 12%). Interestingly, these differences mostly depend on the type of tumour that the patient is harbouring.

In patients with MBC, CTC counts are generally higher by CellSearch than by ISET. The lower detection using ISET may be explained by the loss of CTC at different times of the process: (i) through the pores of $8 \mu\text{m}$ during the procedure of filtration; (ii) during antigenic retrieval performed at 98°C in an alkaline (pH: 9.9) buffer before immunolabelling, and/or; (iii) during the sequential washes used during the immunostaining procedure performed after filtration. Alternatively, CTC identified by CellSearch may not be true CTC. Indeed, CTC are detected by CellSearch on the basis of the expression of an epithelial marker (EpCAM), which does not formally establish the malignant nature of circulating cells in the blood retained as CTC. However, the specificity of CellSearch has been reliably documented in normal individuals and in patients with benign tumours (Allard *et al*, 2004). Therefore, the lower CTC counts obtained by ISET compared with CellSearch, likely results from cell loss during the ISET procedure. In order to minimise this cell loss, we currently bypass the critical antigen retrieval step and use more sensitive methods with immunofluorescent antibodies.

Overall, our results indicate a better detection of CTC in patients with MPC and MLC, *via* ISET than CellSearch. Low count of CTC with CellSearch has already been reported by other groups in MLC (Allard *et al* 2004; Okumura *et al* 2009). However, this study provides direct evidence for the first time that CTCs are underestimated by CellSearch in MPC and MLC patients because higher CTC levels are detected using another technique. All patients with MPC and 17 out of 20 patients with MLC had primary carcinomas of glandular origin, usually expressing the EpCAM antigen. These results may, in part, reflect data observed in experimental tumour models suggesting a continuum during the so-called EMT with the development of discrete tumour

phenotypes, ranging from epithelial differentiation to mesenchymal phenotype and including patterns with various epithelio-mesenchymal mixed phenotypes (Mego *et al*, 2010). As tumour cells undergoing the EMT process are mainly characterised by the loss of epithelial markers, the neexpression of cytoplasmic mesenchymal markers and of additional markers not detectable by CellSearch, the ISET system may be much more efficient in identifying all the cells of interest involved in the process. This has been recently shown in a series of patients with resectable lung cancer, where a significant proportion of CTC identified by ISET either co-expressed cytokeratins and vimentin or expressed vimentin alone (Hofman *et al*, 2011a). In this context, the use of alternative morphology-based enrichment technique such as ISET may offer significant advantages. However, this assay is still cumbersome, time consuming, and despite recent efforts (Hofman *et al*, 2011b) not standardised enough in its current form to be routinely applicable in clinical studies.

The criteria used by CellSearch for identifying CTC are mainly based on the size of the cytokeratin fluorescent signal that should be superior to $4 \mu\text{m}$ and on the location of the DAPI signal, which should be at least 50% inside the cytokeratin signal. It is noteworthy that CTC detection by CellSearch does not rely on any true morphological criteria. In contrast, CTC detected by ISET were identified by an experienced cytopathologist (PV) according to basic morphologic criteria such as a nucleus with a size equal to or larger than two pores ($16 \mu\text{m}$), irregularity of the nuclear contour, the presence of a visible cytoplasm and a high nuclear-to-cytoplasmic ratio (>0.8). The size of a normal eukaryotic cell usually ranges from 8 to $100 \mu\text{m}$ and tumour cells are generally bigger than their normal counterpart. The threshold of $16 \mu\text{m}$ (two-fold the diameter of a filter pore and the size of the smallest normal cell) was set to exclude most of the normal circulating blood cells. Several cells were classified as atypical because they either presented some but not all cytomorphological criteria (for example, nucleus size smaller than $16 \mu\text{m}$) or were damaged. We obviously assume that some of these atypical cells may be malignant leading to an underestimation of CTC counts by ISET. Future studies combining morphological, phenotypical and molecular characterisation will provide additional information assessing or not their tumoural origin. We also decided to retain as CTC cells those that presented all the expected cytomorphological criteria required to establish the diagnosis of tumour cells, even if they were not stained by specific antibodies (data not shown). As we used an aggressive staining procedure based on antigenic retrieval to improve immunostaining, it is possible that some of these unstained cells were CTC negative for the selected marker thus potentially reflecting tumour cell phenotypic heterogeneity. Microemboli (namely, clusters of CTCs) that are rarely detectable by CellSearch were frequently observed by ISET (Figure 1). Within these microemboli, CTC counting was quite difficult and may have been underestimated in some patients.

In conclusion, by directly comparing CellSearch and a morphology-based enrichment technique (ISET), our study provides strong evidence that the CellSearch system, as well as potentially other current technologies that limit CTC capture to EpCAM-positive cells, does present important limitations. The limitations of the CellSearch system mainly concern patients with MLC, supporting the hypothesis of a phenotypic heterogeneity possibly linked to downregulation of the epithelial phenotype in these patients. Whether ISET is a more appropriate technique to enumerate and characterise CTC in patients bearing certain types of metastatic tumours such as MLC, is still a matter of debate. Our study did not compare the clinical relevance of both methods. Further studies on larger cohorts of patients are obviously needed to assess this important issue. ISET could indeed represent a more accurate clinical tool for predicting patient's outcome in certain tumour types, and provide a significant advantage for performing molecular analyses in the era of personalised medicine.

REFERENCES

- Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K (2008) Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 14: 5013–5021
- Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10: 6897–6904
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 3213–3221
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351: 781–791
- De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14: 6302–6309
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW (2006) Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 15: 4218–4224
- Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Mourad N, Butori C, Selva E, Poudoux M, Sibon S, Kelhef S, Vénissac N, Jais JP, Mouroux J, Molina TJ, Hofman P (2011a) Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 17: 827–835
- Hofman VJ, Ilie MI, Bonnetaud C, Selva E, Long E, Molina T, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Butori C, Mourad N, Poudoux M, Bahadoran P, Sibon S, Guevara N, Santini J, Vénissac N, Mouroux J, Vielh P, Hofman PM (2011b) Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: promises and pitfalls. *Am J Clin Pathol* 135: 146–156
- Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG, Top B, Perebolte L, van't Veer LJ, Rodenhuis S (1999) Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 56: 219–231
- Mego M, Mani SA, Cristofanilli M (2010) Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 7: 693–701
- Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D (2006) Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 12: 130–1399
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW (2009) Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35: 463–474
- Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto M, Takuwa T, Kondo N, Hasegawa S (2009) Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients. *Ann Thorac Surg* 87: 1669–1675
- Paterlini-Brechot P, Benali NL (2007) Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 253: 180–204
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265–273
- Qi X, Yang X, Fan L, Zhang Y, Zhang F, Jiang J. (2010) Association between the spread of circulating tumor cells and breast cancer subtypes. *Br Cancer Res* 12: 402–403
- Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M (2005) Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 92: 906–912
- Sahai E (2007) Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer*; 7: 737–749
- Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J (2008) Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68: 989–997
- Siewerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA (2009) Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 101: 61–66
- Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Lüchtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC (2000) Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 18: 1432–1439
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890
- Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, Elst HJ, Van Laere SJ, Prové A, Maes H, Huget P, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY (2010) Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK 19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 102: 276–284
- Vona G, Estepa L, Bérout C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, Mineur A, Franco D, Lacour B, Pol S, Bréchet C, Paterlini-Brechot P (2004) Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology* 39: 792–797
- Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Brechot P (2000) Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 156: 57–63

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License.

IV. Discussion

Ce travail a permis de montrer une différence dans la capacité de détection des CTC dans une cohorte de patients atteints de différents cancers d'origine épithéliale en fonction de la technique utilisée. Le nombre de CTC évalué en employant deux plateformes technologiques utilisant des moyens de capture différents, dans trois cohortes de patients atteints de cancers d'origine épithéliale différente, n'est que partiellement concordant dans le cas de patients atteints de cancers de la prostate ou de cancer du sein et est très discordant chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules. Ces premiers résultats permettent de suggérer l'intérêt potentiel de développer des plateformes de capture et de détection alternatives de CTC, en particulier qui ne soient pas basées sur l'enrichissement en cellules EpCAM positives comme avec le système CellSearch® pour l'étude de cancers d'origine non épithéliale, mais aussi pour des cancers d'origine épithéliale comme les cancers bronchiques (Plaks et al, 2013).

IV.1 Le processus métastatique

Le but de notre étude n'était pas d'apporter de nouvelles connaissances dans la compréhension du processus métastatique compte tenu de la complexité des mécanismes impliqués, mais de positionner l'étude des CTC dans le domaine de la cancérologie comme un potentiel biomarqueur (Pantel et al, 2010 ; Alix-Panabiere et al, 2012). En ce sens, il faut rappeler que la première cause de décès par cancer est le développement d'une maladie métastatique devenue résistante aux différentes stratégies thérapeutiques. La prise en charge multidisciplinaire des patients atteints de cancer est basée sur l'analyse anatomo-pathologique de la biopsie tumorale, indispensable avant toute prise en charge thérapeutique (à l'exception des rares cas de tumeurs germinales avec métastases pulmonaires et augmentation majeure de l'hCG, relevant d'un traitement en urgence sans preuve histologique formelle compte tenu de l'urgence thérapeutique et de l'absence d'autre diagnostic possible), un bilan d'extension pour définir l'atteinte locale, locorégionale et à distance (classification TNM), et une évaluation globale du patient (Bidard et al, 2012). De manière importante, à l'ère des TMC, la classification TNM établie en 1943 par Pierre Denoix reste toujours d'actualité et permet de définir la stratégie thérapeutique dans la majorité des pathologies cancéreuses en ce début de XXIème siècle. La présence de métastases, au diagnostic ou au cours de l'évolution du cancer, reste un facteur pronostique défavorable important quel que soit le type tumoral, à l'exception des leucémies, par essence disséminées (Jemal et al, 2010 ; Hill et al 2011).

Le potentiel métastatique des cellules tumorales est une des caractéristiques fondamentales de tout cancer et représente l'étape ultime du développement tumoral (Hanahan et al, 2001 ; Hanahan et al, 2011). Plusieurs modèles précliniques ont été étudiés pour permettre de mieux comprendre les différentes étapes de ce mécanisme complexe (Van't Veer et al, 2004 ; Bidard, Pierga et al, 2008; Bidard et al, 2011 ; Klein et al, 2008). Le développement de nouveaux modèles du processus métastatique chez des souris « engineered mouse models » (GEMM), ou celui des xénogreffes dérivées de patients (« Patient-derived tumours xenografts » ou PDX) devraient permettre d'améliorer la connaissance du processus métastatique (Bidard et al, 2012). Bien qu'il existe encore beaucoup de débats autour des mécanismes moléculaires précis du processus métastatique, il est classique de décrire celui-ci comme une succession de différentes étapes (Mundy et al, 2002 ; Nguyen et al, 2009) : détachement cellulaire et invasion de la matrice extracellulaire, intravasation, survie dans la circulation (avec présence des CTC dans le flux sanguin), extravasation et prolifération dans le site métastatique, dormance des cellules circulantes (CTC) dans l'organe « hôte », possible recirculation des CTC dans d'autres organes, et évolution des cellules tumorales dans des organes à distance (Pantel et al, 2004). Il est aussi important de rappeler, contrairement à ce que pourrait laisser supposer le sens commun, que le processus métastatique est en grande partie inefficace, et que seule une infime fraction des cellules tumorales circulant dans le sang seront capables de coloniser un organe et de se développer pour former une métastase (Fidler et al, 2003 ; Fidler et al, 1970). Paget a été le premier à proposer l'hypothèse de l'importance de l'environnement dans le processus métastatique dans sa

théorie du « seed and soil », pour expliquer que le développement des métastases n'était pas dû au hasard, mais que l'interaction entre les cellules tumorales et le microenvironnement local était capitale dans la formation des métastases (Paget, 1889). Des interactions moléculaires complexes (avec en particulier le système des chémokines) sont nécessaires entre les cellules tumorales et le stroma pour permettre l'invasion métastatique et la sélection d'un organe cible (Nguyen, Boss and Massague et al, 2009 ; Chiang et Massague et al, 2008).

Une étape importante concerne l'intravasation et la survie des cellules tumorales dans la circulation. Récemment, il a été suggéré que les cellules tumorales devaient subir une modification de leur phénotype, appelé transition épithélio-mésenchymateuse pour devenir capable de métastaser (Chaffer and Weinberg et al, 2011; Thiery et al, 2002). Durant ce processus très proche de certaines modifications cellulaires du développement embryonnaire, les cellules tumorales épithéliales présentent des modifications de leur cytosquelette, une perte de la polarité cellulaire et une perte de l'attachement inter-cellulaire (par la modulation de l'expression des intégrines et de la E-cadherine). Les cellules tumorales acquièrent ainsi un phénotype dit « mésenchymateux » leur permettant d'être plus mobile et de circuler dans le sang. Lors de l'extravasation dans le site métastatique, les cellules tumorales récupèrent un phénotype épithélial par un processus de transition mésenchymato-épithélial (Polyak, Weinberg et al, 2009 ; Thiery et al, 2006 et 2009). L'intérêt clinique et biologique de ces observations reste à ce jour non défini. Cependant, ces observations montrent bien l'intérêt des études portant sur les CTC pour une

meilleure description et compréhension du mécanisme de la cascade métastatique « *in vivo* » chez les patients, mais aussi dans les modèles précliniques (Mordant et al, 2011). La signification biologique des CTC dans la formation des métastases n'est quant à elle pas établie. Il a été proposé que certaines CTC ayant un phénotype proche des cellules souches tumorales seraient capables de former des métastases à distance de la tumeur primitive (Joose et Pantel et al, 2013). De plus, il a été suggéré récemment que ces CTC seraient aussi impliquées dans la croissance de la tumeur primitive et qu'elles seraient elles-mêmes capables de former d'autres métastases (FC Bidard et al, 2008; Kim et al, 2009).

Tous ces éléments permettent de souligner l'intérêt de l'étude des CTC comme biomarqueurs du processus métastatique et comme source potentielle de matériel tumoral pour l'étude de processus biologiques chez les patients.

IV.2 Isolement et caractérisation des CTC

La plupart des nouvelles technologies utilisent des propriétés physiques (taille cellulaire, densité, charge électrique) ou biologiques (expression de protéines de surface, viabilité) des CTC qui les distinguent des cellules normales, afin de pouvoir les isoler et les détecter. Un nombre considérable de techniques de détection des CTCs a été développé ces dernières années avec des résultats très prometteurs (Parkinson et al, 2012). Toutes ces techniques nécessitent une étape d'enrichissement pour augmenter les chances de détecter les rares CTC, et un grand nombre de technologies innovantes ont été mise au point incluant la séparation immuno-magnétique, les micro-puces à CTC, les systèmes de filtration, les RT-PCR quantitatives et la microscopie automatisée (Tableau 1) (Georges et al, 2013 ; Parkinsin et al, 2012). Un point important à souligner est que plusieurs travaux ont montré que les CTC sont hétérogènes d'un point de vue phénotypique et moléculaire, et qu'il est donc nécessaire de proposer des approches multiples et basées sur des principes différentes d'enrichissement et de détection dans l'espoir de pouvoir analyser le plus de CTC chez un patient donné qui soient le reflet de la maladie métastatique.

IV.2.1 Première étape d'enrichissement des prélèvements

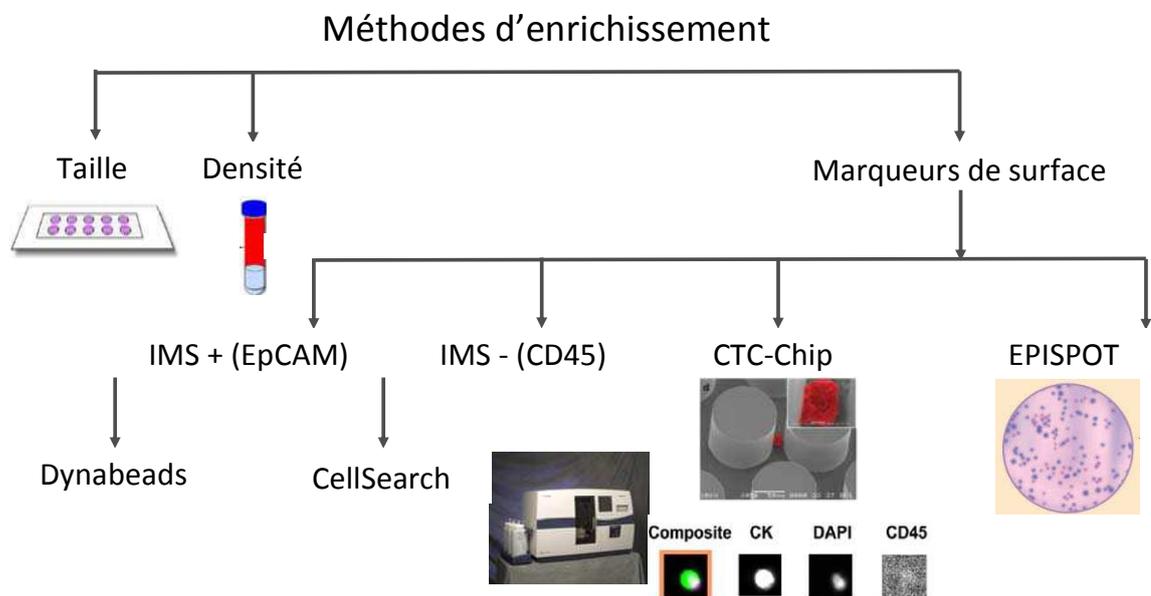
Compte tenu de la difficulté de détecter un très faible nombre de CTC dans le sang des patients, même dans des situations de cancer très avancé (évalué de 1×10^{-5} à 1×10^{-6}), la plupart des protocoles utilisés nécessitent une première étape d'enrichissement afin de diminuer le bruit de fond lié aux cellules normales sanguines et de permettre ainsi la détection et la caractérisation des

CTC (Zach et al, 2006 ; Pantel et al, 2009). Différentes techniques ont été proposées comme les gradients de Ficoll, la séparation sur billes immunomagnétiques, une sélection positive en utilisant des anticorps épithéliaux (comme l'anticorps EpCAM, Epithelium specific adhesion molecule), une sélection négative pour éliminer les cellules hématopoïétiques (en utilisant par exemple l'anticorps CD45), ou encore une séparation basée sur la taille des cellules.

Les techniques utilisées dans cette première étape ont toutes des limites et des avantages qui ont déjà été bien décrits et discutés récemment dans un article d'experts (revue Zach et al, 2006 ; Parkinson et al, 2012). Cependant, il est à noter qu'au delà des problèmes techniques inhérents à chaque approche, cette première étape est capitale pour les résultats ultérieurs. Ainsi, le choix de chaque approche n'est pas anodin et repose en grande partie sur des a priori concernant les CTC. Par exemple, il n'est pas évident que les CTC aient systématiquement une plus grosse taille que les cellules normales du sang ou que les CTC détectées chez des patients ayant un cancer d'origine épithéliale présentent des antigènes épithéliaux de surface. Ainsi, nous avons que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus complexe impliquée dans la mobilité cellulaire, et plusieurs études suggèrent qu'une quantité importante de CTC ayant un phénotype mésenchymal sont présents dans la circulation sanguine. Ces CTC ne seront pas isolées et détectées par les technologies standards comme le CellSearch basées principalement sur des caractéristiques *épithéliales* des CTCs comme la présence d'EpCAM et de cytokératines.

De plus, cette première étape a pour but d'augmenter le nombre de CTC par rapport au nombre de cellules normales dans un prélèvement donné. Pour cela, il est possible soit de diminuer le nombre de cellules normales (sélection négative), d'augmenter le nombre de CTC sur un ou plusieurs critères donnés dans un prélèvement donné (sélection positive) mais il est aussi possible d'augmenter le volume du prélèvement sanguin. Ainsi, à ce jour, des études ont pour but de détecter des CTC à partir d'un volume de sang plus important dans le cadre de protocoles cliniques utilisant une cytophérèse (exemple du projet européen CTCtrap, « Circulating Tumor Cells Therapeutic Apheresis: a novel biotechnology enabling personalized therapy for all cancer patients », financé par FP7-Health-2012-INNOVATION-1). Ces protocoles sont en cours, et il sera utile dans les années à venir de définir et de standardiser les meilleures approches d'enrichissement qui seront conditionnées par les questions posées. Aucune de ces méthodes ne permet de totalement purifier les CTC dans un prélèvement sanguin, et il sera capital de prendre en compte le type de techniques d'enrichissement pour comprendre les résultats publiés sur une technologie de détection des CTC.

Figure 4: Première étape d'enrichissement des CTC. La première étape d'enrichissement en CTC du prélèvement à partir du sang des patients est basée sur les propriétés physiques ou biologiques des CTC (adapté de Alix-Panabière, Pantel et al, 2012)



IV.2.2 Deuxième étape de détection et de capture des CTC

IV.2.2.1 Technologies basées sur la détection des acides nucléiques

Les technologies basées sur la détection des acides nucléiques ont été les premières utilisées dans l'isolement des CTC en permettant la détection de séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN tumoral (Pantel et al, 2009). Ces techniques ont été beaucoup utilisées dans les années 1990 après le développement de la polymérase chain reaction (PCR), notamment dans le mélanome, le cancer du sein et le cancer de la prostate (Morcellin et al, 2006 ; Eschwege et al, 1995 ; Ady et al, 2004 ; Fizazi et al, 2007). Ces techniques de biologie moléculaire reposent sur la détection de séquence d'ARNm qui seraient présents dans les CTC mais pas dans les cellules sanguines normales. Les transcrits sont donc choisis pour être exprimés dans les cellules épithéliales comme la cytokératine 19 (CK19), la mucine 1 (MUC1), HER2 ou la télomérase.

Les limites de l'approche par PCR sont multiples: a) paradoxalement, sa sensibilité qui occasionne la détection de cellules normales circulant à très faible fréquence, b) la difficulté de corrélérer formellement le niveau d'ARNm au nombre de cellules tumorales, c) la difficulté à implémenter cette technique dans des essais cliniques incluant un nombre important de patients, d) l'impossibilité de détecter une hétérogénéité éventuelle d'expression des marqueurs des CTC.

Compte tenu de ces différentes limitations, les études utilisant ce type de technologies sont peu nombreuses. En revanche, les nouvelles technologies basées sur la détection d'ADN ont récemment montré leur intérêt dans l'étude

de l'ADN circulant (ADNcir) qui sera développée dans la deuxième partie de notre travail (Schwarzenbach et al, 2011 ; Perkins et al, 2012).

Tableau 1 : Exemple de différentes plateformes utilisées pour la détection des CTC (adapté de Georges/Pantel 2013)

Technologies	Enrichissement	Identification
CellSearch	Immunomagnétique (ferrofluide EpCAM)	ICC pour CK, CD45, DAPI Autres marqueurs : HER2, EGFR, FISH
AdnaGen	Immunomagnétique (EpCAM)	PCR multiplex (EpCAM ; HER2..)
CTC and HB Chip	Antibody-coated microposts (EpCAM)	EpCAM
GILUPI	Immunomagnétique (EpCAM) avec un nanodétecteur placé dans une veine	EpCAM
ISET	Taille des pores du filtre (8 µm)	
EPISPOT	Centrifugation ou gradient de densité	Détection de protéines sécrétées : PSA, CK19...

EpCAM epithelial cell adhesion molecule ; ICC immunocytochemistry analyses ; CK cytokeratin ; DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole ; HER2 human epidermal growth factor receptor 2 ; FISH fluorescent in situ hybridisation ; PCR polymerase chain reaction ; ISET isolation by size of epithelial tumor cells ; EPISPOT EPithelial ImmunoSPOT ; PSA prostate-specific antigen

IV.2.2.2 Technologies basées sur l'analyse cytologique

Les technologies basées sur l'isolement de cellules ont l'avantage de permettre l'analyse de leur morphologie, leur caractérisation phénotypique et éventuellement moléculaire. La technique la plus utilisée à ce jour est la plateforme technologique CellSearch® (Veridex, Warren, NJ, USA), basée sur une méthode de cytométrie semi-automatisée. Un des avantages majeurs de cette technologie est d'avoir montré sa reproductibilité, la possibilité de l'utiliser dans des essais cliniques incluant de nombreux patients afin d'évaluer le nombre de CTC comme facteur pronostique dans certains cancers. (Riethdorf et al, 2007; Shaffer et al, 2007). Cette technologie a permis de mettre en évidence, chez des patients atteints d'un cancer métastatique, la présence d'une quantité variable de CTC (avec un seuil de détection d'une cellule dans 7.5 ml de sang) (Allard et al, 2004 ; Riethdorf et al, 2007 ; Kraan et al, 2010).

D'autres technologies basées sur la cytométrie sont en cours de développement. Le système ISET® (Isolation by size of epithelial tumour cells; Rarecells, Paris) que nous avons utilisé dans notre étude, est une technique d'isolement des CTC basée sur la filtration des cellules (Paterlini et al, 2007 ; Farace et al, 2011 ; Hofman et al, 2011). Cette méthode d'enrichissement repose sur le fait qu'il est considéré que les CTC sont plus volumineuses que les autres cellules sanguines circulantes et peuvent donc être retenues par des filtres adaptés (pores cylindriques de 8 microns). Cette plateforme permet de réaliser différentes analyses : comptage optique pour une énumération, caractérisation moléculaires en utilisant l'immunohistochimie ou la FISH sur les CTC isolées, microdissection laser des CTC et extraction de l'ARN ou de l'ADN

pour des analyses moléculaires (mutations, variants d'épissage...). Il a été récemment montré qu'il était ainsi possible de mettre en évidence des anomalies moléculaires comme les translocations ALK dans les cancers bronchiques (Paillet et al, 2013), ou les translocations TMPRSS2-ERG dans les cancers de la prostate (Oulhen et al, AACR 2012). Cette technique a le principal avantage de permettre de détecter des CTC d'une façon indépendante d'un marqueur donné (exemple : EpCAM, Vimentine, CD45 ou autres), et peut donc être utilisé dans différents types tumoraux épithéliaux ou non épithéliaux (sarcome ou mélanome par exemple) (Khoja et al, 2013). Cependant, à ce jour il n'existe pas d'automatisation des différentes étapes du filtrage ou des analyses ultérieures ce qui demande donc un temps de manipulation important et une expertise difficile à acquérir. De plus, l'étape de filtration doit intervenir dans les heures qui suivent le prélèvement du patient ce qui va clairement limiter la dissémination de cette technique, et poser des problèmes importants pour des études multicentriques de grandes envergures nécessitant l'inclusion de plusieurs centaines ou milliers de patients.

Une troisième variante de l'étape d'immuno-enrichissement des CTC utilise les techniques de «puces microfluidiques». Ces systèmes automatisés exploitent la possibilité de séparer une population de CTC homogène au sein d'un prélèvement sanguin en se basant sur les propriétés physiques (taille, masse volumique), mais aussi moléculaires (protéines de surface ou intracellulaire). Schématiquement, ces puces comportent un circuit de très faible diamètre, au sein duquel les fluides (en l'occurrence le sang) vont s'écouler de manière laminaire. Grâce au diamètre particulièrement réduit de ces «conduits», la

fréquence et la durée d'interaction entre les anticorps (disposés sur les parois du circuit) et les CTC augmentent, permettant d'accroître la probabilité de liaison des CTC et donc, la sensibilité générale de la technique. Différentes équipes ont montré des résultats très prometteurs pour l'isolement et la détection des CTC avec ces techniques (Nagrath et al, 2007 ; Maheswaran et al, 2008). L'Institut Curie a mis au point un microsystème de tri cellulaire basé sur l'organisation de billes magnétiques en réseau sur des piliers en 3D. Les CTC sont isolées en fonction de l'expression de certaines protéines de membrane, qui sont reconnues par les anticorps spécifiques fixés sur les billes magnétiques. Ce type de système permet une séparation efficace des CTC de plus de 95%, une détection et une caractérisation des CTC. De plus, récemment Ozkumur et al ont publié des résultats très prometteurs concernant l'utilisation d'une nouvelle génération de "puce microfluidique" appelée "CTC-iCHIP" permettant la détection et la caractérisation de CTC indépendamment de leur statut EpCAM (Ozkumur et al, 2013).

Un autre système original appelé EPIC est basé sur un étalement sur des lames spéciales du prélèvement sanguin sans aucune étape d'enrichissement. Cette technique a donc pour avantage de ne pas avoir une sélection a priori sur la taille des CTC ou l'expression de marqueur de surface. La détection des CTC est assurée par une immunofluorescence utilisant le DAPI, la cytokératine, et le CD45. Cette étape de marquage et de lecture est complètement automatisée. De plus, il est possible de compléter la caractérisation des CTC par une analyse FISH de certains gènes d'intérêt. Une première étude présentée au congrès de l'ASCO GU en 2013 a montré des résultats

encourageants sur des prélèvements de patients ayant des cancers de la prostate. Dans une cohorte de 49 patients, il a été possible de mettre en évidence une déletion de PTEN en immunofluorescence sur les CTC, et le statut PTEN sur les CTC était concordant avec celui de la métastase ou de la tumeur primitive dans 75% des cas où il avait été possible d'analyser le tissu tumoral (Punnoose et al, 2013).

Un autre système utilise les propriétés physiques diélectriques et polarisantes des CTC par rapport aux cellules normales. Il est connu que propriétés diélectriques et polarisantes des cellules sont dépendantes de leur diamètre, de leur morphologie et de leur conductivité. Les différences phénotypiques entre CTC et cellules normales sont responsables d'une polarisation différente lorsque les cellules sont exposées à un champ électrique. Ainsi le système ApoStream™ permet une séparation des CTC en utilisant les forces diélectrique et hydrodynamique. Une première étude avait montré des résultats très encourageants (Gupta et al, 2012), et d'autres études suggèrent l'intérêt de ce type d'approche en particulier pour l'étude des mécanismes de EMT ou pour la caractérisation de l'hétérogénéité des CTC.

IV.2.3 Comparaison des différentes approches de détection des CTC

Nous avons vu que différentes approches pour la détection des CTC sont disponibles, et que chacune a pris le parti d'exploiter des caractéristiques particulières des CTC pour pouvoir les isoler et les analyser (Alix-Panabiere et al, 2008 et 2012) (Tableau 2). Peu d'études ont comparé les différentes techniques entre elles sur un même prélèvement, et il est donc difficile de statuer sur les avantages et inconvénients de chaque méthode (Lianidou et al, 2011). De même, il est important de rappeler que toute nouvelle technologie de détection des CTC devrait s'astreindre à un minimum de pré-requis permettant son analyse critique et son éventuelle validation dans le but d'une application clinique future comme rappelé dans la réunion de consensus des experts de l'étude des CTC à savoir par exemple: conditions de collecte des prélèvements, types de tube, matériels de laboratoire utilisés, conditions de recueil et de conservation des prélèvements, calibration et vérification des tests dans un même laboratoire et entre différents laboratoires (Parkinson et al, 2012).

Notre travail suggère que la capacité de détection des CTC est variable d'une technologie à l'autre, mais aussi selon le type de cancer d'origine épithéliale. La technologie CellSearch® ne permet de détecter que des CTC de tumeurs épithéliales, compte tenu du fait que la capture des CTC utilise un anticorps dirigé contre EpCAM (Allard et al, 2004 ; Pantel et al, 2013). Cependant, d'autres technologies comme ISET® ou les techniques basées sur les acides nucléiques peuvent être utilisées pour des tumeurs non épithéliales comme les sarcomes ou les mélanomes.

Tableau 2: Résumé des avantages et des limites de chaque approche pour la détection des CTC chez les patients atteints de cancer (adapté de Alix-Panabière et al, 2008 et 2013; Krebs et al, 2012)

Méthodes de détection	
<i>Technologies basées sur l'analyse cytologique</i>	
Avantages	<ul style="list-style-type: none">▪ Analyse morphologique des CTC▪ Analyse phénotypique avec plusieurs anticorps▪ Quantification directe▪ Isolement des CTC pour des analyses moléculaires
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">▪ Analyse subjective de la détection des CTC▪ Durée du screening des CTC
<i>Technologies basées sur les acides nucléiques</i>	
Avantages	<ul style="list-style-type: none">▪ Haute sensibilité des PCR▪ Détection des CTC indépendante de l'observateur▪ Haute spécificité de la détection quantitative par RT-PCR
Limites	<ul style="list-style-type: none">▪ Perte de l'expression des ARN messenger▪ Expression par les cellules normales▪ Pas d'isolement des CTC

De plus, il est possible de modifier la procédure de la technologie CellSearch® en changeant l'anticorps de capture pour permettre d'isoler des CTC de patients atteints de ces pathologies, en particulier les patients atteints de mélanomes (Khoja et al, 2012). Enfin, les méthodes d'analyses de l'ADN circulant qui ne nécessitent pas d'enrichissement et pas de sélection sur les marqueurs de surface épithéliaux pourront être utilisées dans tous les types tumoraux (Schwarzenbach et al, 2011 ; Perkins et al, 2012).

Cependant si nous prenons l'exemple de patients ayant un cancer d'origine épithéliale comme le cancer du sein, de la prostate ou du poumon, nous avons montré dans notre travail que pour un même patient deux technologies différentes de détection des CTC peuvent donner une information discordante. Des données solides et robustes existent pourtant pour la détection des CTC dans ces trois types de cancer en utilisant la technologie CellSearch®. Les premières études réalisées avec cette méthode ont montré la présence de CTC dans une grande proportion de cancers métastatiques (Allard et al, 2004). En effet, 64% des patients atteints de cancers métastatiques avaient au moins une CTC détectable et 36% au moins 2 CTC détectables sur des échantillons de 7,5 ml de sang. A l'inverse, seule une très faible proportion (1%) de patient atteint d'une tumeur bénigne avait 2 CTC/7.5ml et aucun patient en bonne santé n'avait de CTC détectable. Plusieurs autres études rétrospectives ou prospectives ont montré qu'il est fréquent de détecter des taux élevés de CTC chez des patients ayant un cancer du sein, de la prostate ou du poumon avancé. Par ailleurs, ces études ont montré un lien entre la présence de cellules tumorales détectées par la méthode CellSearch® et la survie sans

progression ou encore la survie globale à partir d'importantes cohortes de patients atteints de cancers métastatiques mammaires, colorectaux et de la prostate (Tableau 3). Dans les cancers mammaires métastatiques, 49% des patientes avaient au moins 5 CTC/7.5ml de sang avant le traitement (Cristofanilli, 2004). Dans les cancers digestifs métastatiques, 26% des patients avaient au moins 3 CTC/7.5ml de sang avant le traitement (Cohen et al, 2008). Les patients atteints de cancers de la prostate présentaient un nombre plus important de CTC avec 57% des patients ayant au moins 5 CTC/7.5ml avant le traitement (de Bono et al, 2008).

Tableau 3: Taux de CTC détectées par la méthode CellSearch® et survie globale à partir d'importantes cohortes de patients atteints de cancers métastatiques mammaires, colorectaux, bronchiques et de la prostate (Cohen et al, 2008; Cristofanilli et al, 2004; de Bono et al, 2008 ; Krebs et al, 2011).

	Nb de patients	Survie globale médiane (mois)		Différence statistique (p)
		Groupe favorable	Groupe défavorable	
Cancer du sein	177	21,9	10,9	<0,0001
Cancer de la prostate*	231	21,7	11,5	<0,0001
Cancer du colon	430	19,1	11,7	<0,0001
Cancer du poumon	101	8,1	4,3	<0,001

*Cancer de la prostate résistant à la castration

Note : Pour les cancers du sein, de la prostate et du poumon, le seuil définissant le caractère péjoratif du nombre de CTC est retenu à 5 CTC dans 7.5 ml de sang alors que ce seuil est défini à 3 CTC dans 7.5 ml de sang pour les cancers colorectaux.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer ces discordances. Tout d'abord, l'étape d'enrichissement, différente entre les deux techniques, peut expliquer en grande partie la différence de détection des CTC. Dans le système CellSearch®, les CTC ayant acquis un phénotype EMT et ayant perdu leur phénotype épithélial ne seront pas capturées ni détectées. Ceci a été maintenant décrit par plusieurs équipes et pourrait expliquer en grande partie la sous estimation du nombre de CTC chez les patients atteints de cancer du poumon par la technologie CellSearch®. Il a été aussi suggéré que le processus de l'EMT est associé à un phénotype plus agressif de la tumeur (Thompson et al, 2011). Compte tenu de l'importance de l'EMT dans la migration cellulaire, il est important de focaliser une partie des efforts de recherche sur les CTC sur l'identification de marqueurs de l'EMT sur les CTC et développer des méthodes de détections indépendantes des méthodes d'enrichissement basées sur les marqueurs épithéliaux. La plupart des équipes ont donc utilisé des méthodes basées sur la filtration comme l' ISET®, et ont montré qu'un nombre important de CTC ont un phénotype EMT (Charpentier et al, Paillet et al, Hou et al, AJP 2011, Krebs et al, JTO 2012). D'autres équipes ont utilisé des « puces microfluidiques » comme l'étude de l'équipe de Boston qui a utilisé leur méthode HB (herringbone)-CHIP pour capturer les CTC sur des prélèvements de 41 patientes avec des cancers du sein (Yu et al, 2013). Cette étude montre qu'une majorité des patientes présentent des CTC dans leur sang avec un phénotype mésenchymateux, ceci d'autant plus que les patientes sont atteintes de cancer du sein triple négatif ou amplifié HER2. De plus, les auteurs montrent une association intéressante entre les marqueurs de EMT et la présence de «clusters » de CTC. En effet, beaucoup des travaux qui

ce sont intéressés à l'EMT ont montré que les CTC ne semblent pas circuler dans le flot sanguin d'une manière isolée, mais plutôt sous la forme de micro-embolies de CTC, et que le phénotype des CTC ou des CTM (« circulating tumor microemboli ») qui maintiennent un contact inter-cellulaire dans le flux sanguin, montre une certaine hétérogénéité des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. (Hou et al, 2011 ; Lecharpentier et al, 2012 ; Krebs et al, 2012 ; Yu et al, 2013).

A l'inverse, l'isolement des CTC par la technologie ISET® est basé sur un enrichissement par la taille des cellules et les propriétés physico-chimiques des CTC. La procédure du protocole ISET® est plus longue et plus difficile, et il est possible qu'un certain nombre de CTC soient perdues durant les procédures de lavage et d'immunohistochimie. Ainsi, le plus grand nombre de CTC détectées par CellSearch® pourrait être expliqué par une procédure plus longue et moins automatisée avec la technique ISET® (Farace et al, 2011). De plus, le postulat que la taille des CTC est plus importante que la taille des cellules normales n'a jamais été clairement évalué. En se référant à la technique de référence CellSearch® et aux récents travaux effectués, il est possible de mettre en évidence des « petites cellules » capturées par le système qui ne sont pas considérées comme des CTC classiques mais qui pourraient correspondre à des CTC de petite taille (Coumans et al, 2010).

Notre travail montre donc qu'il n'existe pas de technologie « idéale », et qu'il est important de pouvoir comparer chaque technologie entre elles, dans des

populations définies de patients, mais aussi en fonction d'une question clinique ou biologique pré établie :

- La méthode CellSearch® est une méthode robuste, reproductible, avec une possible implémentation dans des protocoles cliniques de recherche.
- Cependant, notre travail montre que cette méthode a un certain nombre de limites et qu'il est souhaitable de développer des méthodes alternatives pour détecter les CTC dans certains types de cancer, ou pour poser des questions biologiques particulières comme la caractérisation de l'EMT.
- A chaque question clinique ou biologique, il est indispensable de définir les limites et les avantages de chaque méthode et de choisir en conséquence la meilleure plateforme existante.
- Un effort important de validation et de suivi de l'assurance qualité des tests est capital si nous souhaitons utiliser ces découvertes récentes dans la prise en charge des patients en clinique.

IV.3 Perspectives et limites de l'étude des CTC

La possibilité d'isoler, de compter et d'étudier les CTC dans le sang des patients permet d'envisager plusieurs types d'applications en recherche clinique et fondamentale et pourrait modifier différents domaines de la prise en charge des patients atteints de cancer (Krebs et al, 2011) (Tableau 5). Les CTC peuvent apporter trois types d'information :

- une information pronostique initiale,
- une corrélation entre l'énumération des CTC et l'efficacité du traitement,
- et la caractérisation des cibles thérapeutiques exprimées par les CTC.

L'ensemble unanime de toutes les études publiées rapporte que la détection des CTC est un facteur pronostique majeur et indépendant en phase métastatique. Les études princeps qui ont utilisé le système CellSearch® ont permis de suggérer le potentiel intérêt de la détection des CTC chez les patients avec un cancer avancé, en particulier avec l'énumération des CTC. Il faut rappeler que pour utiliser les CTC en pratique clinique, il est absolument nécessaire de démontrer au préalable que leur utilisation est capable de modifier la prise en charge des patients et qu'il est donc indispensable de répondre aux différentes questions posées par des essais cliniques adéquats.

Tableau 4: Applications potentielles de l'analyse des cellules tumorales circulantes (CTC) (adapté de Alix-Panabière et al, 2008 et 2013; Krebs et al, 2012).

Compte des CTC

- ➔ Définition du pronostic
- ➔ Suivi de la réponse thérapeutique (marqueur prédictif et pharmacodynamique)
- ➔ Détection de rechute
- ➔ Aide au diagnostic
- ➔ Aide à la décision de traitement adjuvant

Caractérisation moléculaire des CTC

- ➔ Matériel tumoral pour l'analyse d'anomalies moléculaires (« biopsie liquide ») : classification moléculaire des cancers, marqueurs moléculaires pronostiques ou prédictifs, découverte de nouvelles cibles
 - ➔ Détection de profil de résistance à un traitement
 - ➔ Amélioration de la connaissance du processus métastatique
-

IV.3.1 Utilisation du compte des CTC : un nouvel outil pour la stratégie thérapeutique en oncologie?

A ce jour, seule la technologie CellSearch® (Veridex) a fait l'objet de nombreuses publications, unanimes sur le rôle pronostique majeur et indépendant des CTC détectées dans les cancers du sein ou de la prostate. Compte tenu de sa robustesse et de sa simplicité d'utilisation, il est probable que cette technologie restera la technique standard pour le compte des CTC dans la plupart des cancers d'origine épithéliale.

IV.3.1.1 Utilisation des CTC comme facteur pronostique

Les différentes grandes études ayant évalué le taux des CTC avec le système CellSearch® ont permis de montrer la valeur pronostique du taux des CTC dans les cancers du sein, du colon et de la prostate. A ce jour, ce test n'est pas reconnu ni remboursé en Europe, car bien que ces études aient montré que le taux de CTC est pronostique, il n'a pas été montré que la connaissance de ce pronostic soit suffisante pour modifier la prise en charge des patients. Ainsi, des études cliniques futures sont en cours, en particulier dans les cancers du sein pour montrer que le taux de CTC à un temps donné peut modifier à terme la décision thérapeutique et le devenir des patients avec un cancer avancé (Bidard et al, 2013). Ces études interventionnelles en cours dans le cancer du sein sont importantes car elles ont été les premières à être conduites pour montrer que l'énumération des CTC et leur valeur pronostique peut avoir un rôle pour aider le clinicien dans la stratégie thérapeutique.

IV.3.1.2 Utilisation des CTC comme facteur prédictif

Ces études ont aussi montré que la décroissance du taux de CTC en cours de traitement pouvait prédire le devenir des patients. Ainsi, il est possible d'imaginer que l'évaluation du taux des CTC soit proposée de façon précoce pour décider de la poursuite ou non d'un traitement en fonction d'une décroissance jugée ou non favorable. Des essais sont en cours dans les cancers du sein pour montrer que le taux de CTC en cours de traitement peut être utilisé pour guider la thérapeutique (Bidard et al, 2013). Cette stratégie pourrait s'appliquer à d'autres pathologies comme le cancer de la prostate, dans le but de changer précocément un traitement probablement inefficace (Olmos et al, 2009 ; Olmos et al, 2011 ; Scher et al, 2010).

IV.3.1.2 Utilisation des CTC comme critère de jugement intermédiaire

A terme, comme les études décrites précédemment ont montré que la décroissance du taux de CTC était corrélée à la survie globale, il pourrait être envisagé de valider la décroissance du taux de CTC comme un critère de jugement intermédiaire de la survie globale dans les études de phase III et de remplacer la survie globale par le taux des CTC comme objectif principal dans les études randomisées de phase III. A ce jour, par exemple il n'y a pas de critère de jugement intermédiaire de la survie globale validé dans les cancers de la prostate résistants à la castration métastatiques et plusieurs études cherchent actuellement à montrer que le taux de CTC pourrait constituer un tel critère (Scher et al, 2011). Les premiers résultats présentés durant le congrès de l'ASCO en 2011 montrent une bonne corrélation entre le taux de CTC avant traitement et la survie globale (confirmation de la valeur pronostique des CTC),

mais aussi une corrélation entre le taux de CTC après traitement et la survie globale (valeur pronostique de bénéfice au traitement) (Tableau 5). Si ces résultats sont confirmés par d'autres études prospectives en cours dans le cancer de la prostate résistant à la castration, il est possible d'envisager que le taux de CTC après un temps court de traitement puisse être accepté par les autorités réglementaires comme la FDA ou l'EMA, comme un critère principal permettant l'enregistrement d'un médicament en s'affranchissant de la survie globale (Scher et al, 2013).

Tableau 5 : Taux de conversion du groupe défavorable (≥ 5 CTC) au groupe favorable (< 5 CTC) chez les patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration inclus dans l'étude de phase III COU-301 randomisant l'acétate d'abiraterone plus prednisone à un placebo plus prednisone (Scher et al, ASCO 2011 ; DeBono et al, 2011 ; Fizazi et al, 2012).

Nombre de patients avec ≥ 5 CTC avant traitement						
	Semaine 4 422		Semaine 8 374		Semaine 12 330	
Traitement	AA (n=272)	Placebo (n=150)	AA (n=245)	Placebo (n=129)	AA (n=217)	Placebo (n=113)
Conversion	42% (n=113)	14% (n=21)	50% (n=123)	17% (n=22)	48% (n=105)	17% (n=19)
<i>p value</i>	<0,0001		<0,0001		<0,0001	

IV.3.2 Caractérisation moléculaire des CTC : vers l'utilisation de la «biopsie liquide» ?

Comme nous l'avons vu, une des limites majeures des études se contentant de compter les CTC est l'absence d'aide au choix thérapeutique. Dans la majorité des cas, dans la mesure où tous les patients atteints de cancers métastatiques vont à terme décéder de leur maladie, la question n'est pas de savoir « qui traiter », mais plutôt « quel traitement proposer ». Depuis le développement des thérapies moléculaires ciblées (TMC), la caractérisation moléculaire du tissu tumoral est devenue primordiale dans la recherche en thérapeutique anticancéreuse. Les technologies d'analyse moléculaire sont au centre des projets de médecine moléculaire ou « médecine personnalisée », et ont déjà permis une nouvelle classification moléculaire des cancers (deBono et al, 2011 ; Rordon et al, 2012). Ainsi, il a été montré qu'une maladie fréquente comme le cancer du poumon non à petites cellules est en réalité un ensemble de pathologies plus rares définies par des altérations moléculaires différentes comme les mutations EGFR, la translocation ALK, les mutations ou amplification du gène HER2, si bien que la prise en charge de ces maladies est désormais adaptée selon leur profil moléculaire (Besse et al, 2011). Dans cette optique, il est important de mettre en évidence des marqueurs pharmacodynamiques, et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de sensibilité et de résistance aux thérapeutiques. Contrairement aux hémopathies malignes où il est commun de suivre l'évolution des pathologies tumorales en cours de traitement en réalisant le suivi des cellules tumorales dans le sang ou dans la moelle osseuse en utilisant des techniques de biologie moléculaire, il sera difficile de proposer des biopsies tumorales successives et

répétées dans la grande majorité des patients atteints d'une tumeur solide (Krebs et al, 2011). Ainsi, l'isolement des CTC peut représenter une source de matériel tumoral pour mettre en évidence des anomalies moléculaires connues (comme les mutations EGFR, les translocations ALK dans le cancer du poumon ; les amplifications de HER2 dans les cancers du sein ; les amplification du récepteur des androgènes ou les translocations TMPRSS2 dans les cancers de la prostate), découvrir de nouvelles altérations moléculaires, mettre en évidence des mécanismes de résistance à des thérapeutiques ou au contraire des marqueurs de sensibilité.

Tableau 6 : Thérapies moléculaires ciblées ayant démontré un bénéfice dans des populations de patients atteints de cancers avec une altération moléculaire définie (adapté de Rordon et al, 2012).

Pathologie	Altération moléculaire/cible	Médicament
Cancer du poumon	Mutation EGFR	Inhibiteur de EGFR
Cancer du sein	Amplification HER2	Inhibiteur de HER2
GIST	Mutation KIT et PDGFRA	Inhibiteur de KIT
Mélanome	Mutation BRAF	Inhibiteur de BRAF
Cancer du poumon	Translocation EML4-ALK	Inhibiteur de ALK
Sarcome d'Ewing	Translocation EWS-FLI	Anti-IGF-1R
Médulloblastome	Mutations PTCH1 ou SMO	Inhibiteur de SMO
Cancer du sein, de l'ovaire et de la prostate	Mutations BRCA1/BRCA2	Inhibiteur de PARP

IV.3.2.1 Utilisation des CTC comme source de matériel tumoral

Plusieurs équipes ont montré qu'il est possible de caractériser d'un point de vue moléculaire les CTC isolées par différentes plateformes technologiques. Il a été ainsi montré qu'il est possible de mettre en évidence des amplifications de gènes (comme HER-2 dans les cancers du sein) (Riethdorf et al, 2010), ou des translocations (comme la translocation TMPRSS2-ERG dans les cancers de la prostate, ou la translocation ALK dans les cancers du poumon) (Attard et al, 2009 ; Leversha et al, 2009). A terme, il est possible d'imaginer que l'analyse des CTC pourrait en partie remplacer une biopsie tumorale, et devenir une vraie « biopsie tumorale liquide ». Il est cependant à noter qu'il existe à ce jour peu d'études ayant comparé le phénotype moléculaire des CTC et les altérations moléculaires de la tumeur primitive et des métastases chez un même patient. Ces études sont indispensables avant de valider les CTC comme matériel tumoral disponible pour guider un traitement.

IV.3.2.1 Utilisation des CTC et mécanismes de résistance

Comme il est possible de mettre en évidence des altérations moléculaires présentes dans la tumeur en début de traitement, il est aussi possible d'analyser l'expression de différents gènes ou protéines en cours de traitement qui pourraient prédire la réponse ou la résistance à un traitement. Ainsi, il a été montré dans un travail princeps qu'il était possible d'étudier l'expression de IGF1-R dans des CTC, et que cette expression était corrélée à la réponse à des inhibiteurs de IGF1-R chez des patients atteints de cancer de la prostate (DeBono et al, 2007). De même, l'expression de Bcl2 dans des CTC

de patients atteints de cancer du poumon à petites cellules a été montrée comme prédictive de la réponse à des inhibiteurs de Bcl2 (Gandhi et al, 2011).

IV.3.2.3 Compréhension des mécanismes du processus métastatique

La caractérisation moléculaire des CTC chez des patients atteints de cancers avancés ou localisés peut aussi nous donner des informations capitales concernant la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de métastases. Comme montré ci dessus, il est ainsi possible de mettre en évidence dans des CTC de patients atteints de cancer du poumon l'expression concomitante de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux qui confirment la théorie de la transition épithélio-mésenchymateuse (LeCharpentier et al, 2010 ; Hou et al, 2010 ; Hofman et al, 2011). De même, l'étude de marqueurs du phénotype des cellules souches au niveau des CTC pourrait aussi apporter des données importantes pour la compréhension du mécanisme de métastases (Mego et al, 2010 ; Reuben et al, 2011). Enfin, il pourrait être proposé d'évaluer la viabilité et le potentiel des CTC en proposant des protocoles de xenogreffes de CTC dans des modèles murins (Pantel et al, 2013 ; Baccelli et al, 2013).

Partie II

**Intérêt de l'étude des cellules circulantes
comme facteur pronostique de la survie
des patients atteints de cancers avancés
inclus dans des essais précoces**

I. Contexte de l'étude

Les phases I ont un rôle majeur dans la démarche méthodologique pour le développement d'un nouvel anticancéreux. La phase I d'une nouvelle molécule est le premier passage chez l'homme d'un composé qui a été étudié pendant des années dans les laboratoires de recherche. Son premier objectif est d'identifier les doses d'utilisation du médicament dans des conditions de sécurité satisfaisante pour les développements ultérieurs en phase II et III. Les objectifs secondaires sont de décrire les effets toxiques, de donner des informations essentielles quant à la pharmacologie clinique chez l'homme, d'essayer de préciser un effet sur une cible bien définie et finalement de reconnaître éventuellement une activité anti-tumorale chez le malade. Ces essais de phase I ont ainsi pour but non seulement de déterminer la toxicité de nouveaux agents, mais aussi de valider les hypothèses et la preuve du concept de leur potentielle activité anti-tumorale qui ont été à l'origine de sa création. De plus, la phase I est enfin une phase critique car ces résultats peuvent interrompre toute décision de poursuite du développement (go/no go décision).

Comme nous l'avons vu précédemment, les TMC ont radicalement modifié la prise en charge des patients atteints de cancer métastatique (Haber et al, 2011). La terminologie «thérapies moléculaires ciblées» fait référence à des stratégies thérapeutiques dirigées contre des anomalies moléculaires supposées impliquées dans le processus de transformation néoplasique. Le développement de ces nouveaux médicaments est en fait parallèle au développement d'une approche basée sur la biologie moléculaire et non plus

seulement clinique et morphologique de la maladie cancéreuse (Weinberg et al, 2001 ; Debono et al, 2010). Ces études ont permis de mieux caractériser d'un point de vue moléculaire les différents types de cancers, et de commencer à raisonner non plus en «maladie d'organe» (cancer du sein, cancer du poumon, cancer de la prostate, cancer du colon...), mais de classer les cancers en fonction de certaines anomalies moléculaires qui sont impliquées dans le processus cancéreux (cancer du sein HER-2 positive, mutation de *EGFR* de certains cancer du poumon, mutation *KRAS* des cancers du colon). Il ne s'agit cependant pas d'un concept tout à fait nouveau en cancérologie car les modulations hormonales réalisées pour le traitement des phases métastatique ou adjuvante du cancer du sein, de la prostate ou de la thyroïde, ont démontré de longue date leur bénéfice thérapeutique. Ces traitements peuvent être considérés comme les «ancêtres» des TMC car ils agissent sur des anomalies moléculaires de cancers hormono-dépendants et ces récepteurs hormonaux (aux oestrogènes pour le cancer du sein, récepteurs aux androgènes pour le cancer de la prostate) sont bien directement impliqués dans le processus néoplasique. A ce jour, plus d'une dizaine de thérapies ciblées ont l'AMM pour le traitement de patients atteints de cancer avancé ou en situation adjuvante (Ma et al, 2009 ; Krause et al, 2005).

Compte tenu de l'importance stratégique des essais précoces dans le développement des TMC, il existe un intérêt majeur dans le développement de biomarqueurs pronostiques et prédictifs de l'efficacité ou de la toxicité des nouveaux médicaments évalués dès les premières étapes de la phase I (Yap et al, 2013 ; Carden et al, 2010 ; Lorusso et al, 2010). En effet, les phases

précoces sont un moment unique dans la vie d'un médicament pour pouvoir évaluer au plus près les effets du médicaments chez l'homme, mais aussi générer un certain nombre d'hypothèses qui pourront être validées ensuite au laboratoire ou dans de plus grandes études de phase II ou III (Yap et al, 2010). Compte tenu de la balance risque/bénéfice des protocoles de phase I, il est classique d'inclure en phase I des malades qui ont un cancer évolutif et pour lequel il existe aucune alternative thérapeutique ni en phase III ni en phase II. Cependant, l'état général du malade doit être bon de manière à ce que les aggravations éventuelles observées ne puissent pas être imputées à l'histoire naturelle de la maladie. Néanmoins, il reste toujours difficile d'évaluer le pronostic de ces patients inclus en phase 1, et plusieurs groupes ont essayé de définir des critères objectifs pour mieux sélectionner les patients à qui il est proposé ce type d'essais (Ploquin et al, 2012).

Compte tenu de l'importance du processus métastatique chez les patients ayant un cancer avancé, nous avons fait l'hypothèse que des marqueurs circulants pourraient nous aider à mieux définir le pronostic des patients inclus en phase 1. Compte tenu de l'importance du mécanisme d'angiogenèse dans le processus métastatique, nous avons décidé d'évaluer l'intérêt des cellules endothéliales circulantes (CEC), mais aussi des cellules endothéliales progénitrices (CEP) comme paramètre biologique de l'angiogenèse qui pourraient être en relation avec un comportement biologique plus agressif de certaines pathologies, et avoir une corrélation avec le pronostic de ces patients inclus en phase 1.

II. Objectifs de l'étude

Ce travail avait pour but d'étudier la relation entre le devenir des patients atteints de cancers avancés inclus dans des études de phase I/II à l'Institut Gustave Roussy. A partir de cette population, le taux de CEC et CEP a été déterminé dans le cadre de différents protocoles dans le laboratoire du Dr Farace (Laboratoire de recherche translationnelle, Unité INSERM U981 « identification of molecular predictors and new targets for cancer treatment ») en utilisant une technique de cytométrie de flux précédemment décrite (Jacques et al, 2008).

Un échantillon de sang a été prélevé chez les patients inclus dans différentes études et qui recevaient un antiangiogénique, à l'inclusion (J1, avant le traitement). Après avoir prélevé 2 ml de sang, le sang était collecté dans un tube Cellsave™ (Immunicon, Huttingdon Valley, PA). Les tubes Cellsave™ contiennent de l'EDTA et un conservateur pour assurer la stabilité des cellules fragiles comme les CEC, et cette technique a été validée dans notre laboratoire pour la mesure des CEC par cytométrie de flux (Jacques et al, 2008). Les échantillons de sang sont conservés à 18-25°C dans le laboratoire et analysés dans les 24 heures. Les CEC, identifiées comme les cellules viables CD31+ CD146+ CD45- 7 amino-actinomycin D [7AAD]-, sont mesurées dans 1 mL de sang total par cytométrie de flux comme décrit précédemment. Les CEP sont identifiées, après enrichissement, comme des événements rares CD45dimCD34+VEGFR2+7AAD-. En bref, le marquage immunofluorescence est réalisé avec les anticorps suivants : anti-CD31 FITC (BD Pharmingen, San

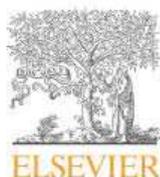
Diego, CA), anti-CD146 PE (clone P1H12, BD Pharmingen), anti-CD45 APC (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Les cellules sont ensuite analysées avec le FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Les données sont analysées en utilisant le programme CELLQuest 3.2 (BD Biosciences).

Cette méthode a permis de déterminer le taux de CEC et de CEP dans cette population de patients sélectionnés avant de débiter le traitement du protocole, et nous avons ensuite étudié la corrélation entre le taux des CEC et CEP, la survie sans progression et la survie globale des patients inclus en phase I/II.

III. Résultats

Les résultats de ce travail ont été publiés en 2012 dans European Journal of Cancer. L'article est reproduit ci-dessous.

Notre travail a permis de mettre en évidence que le taux de CEP est un facteur pronostique majeur de la survie globale dans cette population de patients inclus en phase I. Il a été ainsi montré que le taux médian de CEC était de 12 CEC/ml (0-154/ml), le taux médian de CEP était de 1,3% (0-32,5%). De plus, il existe une corrélation entre la survie globale des patients et le taux de CEP, ainsi que les facteurs cliniques pronostiques validés en analyse multivariée. La survie globale des patients était de 9 mois versus 17 mois pour des patients ayant un taux élevé de CEP par rapport aux patients ayant un taux bas de CEP.



Prognostic value of circulating VEGFR2⁺ bone marrow-derived progenitor cells in patients with advanced cancer

Christophe Massard^{a,c}, Isabelle Borget^b, Marie Cécile Le Deley^b, Melissa Taylor^{c,d}, Carlos Gomez-Roca^a, Jean Charles Soria^{a,c}, Françoise Farace^{c,d,*}

^a Department of Medicine, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France

^b Department of Biostatistics and Epidemiology, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, France

^c University of Paris-Sud, INSERM U 981 "Identification of molecular predictors and new targets for cancer treatment", Institut de Cancérologie Gustave Roussy, France

^d Translational Research Laboratory, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, France

Available online 25 February 2012

KEYWORDS

Circulating bone marrow derived progenitor cells
Circulating endothelial cells
Angiogenesis biomarker
Prognosis
Advanced cancers

Abstract We hypothesised that host-related markers, possibly reflecting tumour aggressiveness, such as circulating endothelial cells (CEC) and circulating VEGFR2⁺ bone marrow-derived (BMD) progenitor cells, could have prognostic value in patients with advanced cancer enrolled in early anticancer drug development trials.

Baseline CECs (CD45^{dim}CD31⁺CD146⁺7AAD⁻ cells) and circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor cells (defined as CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺7AAD⁻ cells) were measured by flow-cytometry in 71 and 58 patients included in phase 1 trials testing novel anti-vascular or anti-angiogenic agents. Correlations between levels of CECs, circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor cells, clinical and biological prognostic factors (i.e. the Royal Marsden Hospital (RMH) score), and overall survival (OS) were studied.

The median value of CECs was 12 CEC/ml (range 0–154/ml). The median level of VEGFR2⁺-BMD progenitor cells was 1.3% (range 0–32.5%) of circulating BMD-CD34⁺ progenitors. While OS was not correlated with CEC levels, it was significantly worse in patients with high VEGFR2⁺-BMD progenitor levels (>1%) (median OS 9.0 *versus* 17.0 months), and with a RMH prognostic score >0 (median OS 9.0 *versus* 24.2 months). The prognostic value of VEGFR2⁺-BMD progenitor levels remained significant (hazard ratio (HR) = 2.3, 95% confidence interval (CI), 1.1–4.6, *p* = 0.02) after multivariate analysis. A composite VEGFR2⁺-BMD progenitor level/RMH score ≥ 2 was significantly associated with an increased risk of death compared to scores of 0 or 1 (median OS 9.0 *versus* 18.4 months, HR = 2.6 (95% CI, 1.2–5.8, *p* = 0.02)).

* Corresponding author at: Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. Tel.: +33 1 42115198; fax: +33 1 42116094.

E-mail address: farace@igr.fr (F. Farace).

High circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor levels are associated with poor prognostics and when combined to classical clinical and biological parameters could provide a new tool for patient selection in early anticancer drug trials.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recent studies have evidenced that rare circulating cells with endothelial features contribute to tumour neovascularisation and possibly metastatic dissemination, therapeutic inhibition of which has yielded considerable interest, and has been validated in the clinic. Angiogenesis is mediated not only by the 'sprouting' of pre-existing differentiated vascular endothelial cells, but also by a systemic host process involving the mobilisation and homing of various bone marrow derived (BMD) progenitors, which include several categories of haematopoietic and vascular progenitors recruited to sites of tumour neovascularisation.¹ One subset called circulating endothelial progenitor cells (referred to as CEP), for which the precise role and phenotypic definition is still debated^{2,3} was reported to incorporate tumour neovessels^{4,5} and to promote the angiogenic switch, key to metastatic progression.⁶ For these reasons, circulating endothelial cells (CEC)- mature cells shed from existing vessels for which high levels are observed in clinical diseases hallmarked by vascular insult including cancer^{7–9} – and BMD progenitor cell subsets are being investigated actively as prognostic and/or predictive biomarkers in patients with cancer as these cell populations could reflect the underlying biological processes regulating tumour growth, potential metastatic dissemination and consequently, the 'angiogenic aggressiveness' of a given tumour.

We hypothesised that patients with advanced solid tumours who are resistant or who have exhausted conventional therapies might share general biological processes reflecting tumour aggressiveness or resistance to therapy. In spite of tumour heterogeneity, patients with advanced solid tumours eligible for phase 1 trials may have such underlying host characteristics contributing to a particularly 'aggressive' tumour phenotype. Despite the number and importance of phase 1 trials for the development of new therapies, medical oncologists are still lacking objective prognostic parameters that could help to foresee which patients will have worse outcome and help guide optimal treatment strategies.^{10–12} A few retrospective studies have identified clinical or biological prognostic factors to help identify patients eligible in phase 1 trials.^{13–18} However, biological parameters reflecting a systemic host-response to an aggressive tumour such as angiogenesis markers may help the oncologist decide on the type of potentially innovative anticancer therapy to be tested in patients. Moreover such a general parameter could help in the decision to exclude patients with the shortest life expectancy unnecessarily exposed to a con-

siderable risk of toxicity since the new agent could substantially affect their quality of life and outcome.

In light of our previous results showing the potential clinical interest of monitoring VEGFR2⁺-BMD progenitor cell mobilisation^{19–21} and CEC²² and in order to investigate new biomarkers of advanced solid tumours, we prospectively investigated levels of BMD progenitor cell subset and CEC levels in cancer patients enrolled in phase 1 trials testing new anti-angiogenic or anti-vascular agents at our institution. While CEC levels were not correlated with overall survival (OS), we observed that high baseline levels of circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor cells were associated with worse prognosis in patients with advanced cancer.

2. Patients and methods

2.1. Study design and patients eligibility

This study considered all consecutive patients treated in five phase 1 trials at the Service des Innovations Thérapeutiques Précoces (SITEP) Institut Gustave Roussy, France, between October 2005 and April 2009. All patients had given their informed consent to take part in phase 1 trials approved by our institutional Review Boards, who also granted approval for the present analysis. Standard clinico-pathological parameters were recorded at study entry, including tumour type, age, sex, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS), full blood count, biochemistry (including serum albumin and lactate dehydrogenase (LDH)), number and sites of metastasis and number of prior cancer treatments. The Royal Marsden Hospital (RMH) score which is based on the serum albumin level (lower than 35 g/L), LDH level (greater than the upper limit of normal (ULN)), and the number of metastatic sites was calculated for each patient.¹⁸ Blood sampling for CEC and progenitor cell enumeration was performed before treatment. After discarding the first 2 mL following venipuncture, 2 mL of whole blood was collected in Cellsave™ preservative tubes (Immunicon Inc., Huntingdon Valley, PA) for CEC analysis⁸ and 10 mL whole blood was collected in standard heparin tubes for CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitors as previously described.^{19–21}

2.2. Measurement of BMD-VEGFR2⁺ progenitor cells

BMD-VEGFR2⁺ progenitor cells were measured in 10 mL of progenitor-enriched whole blood according

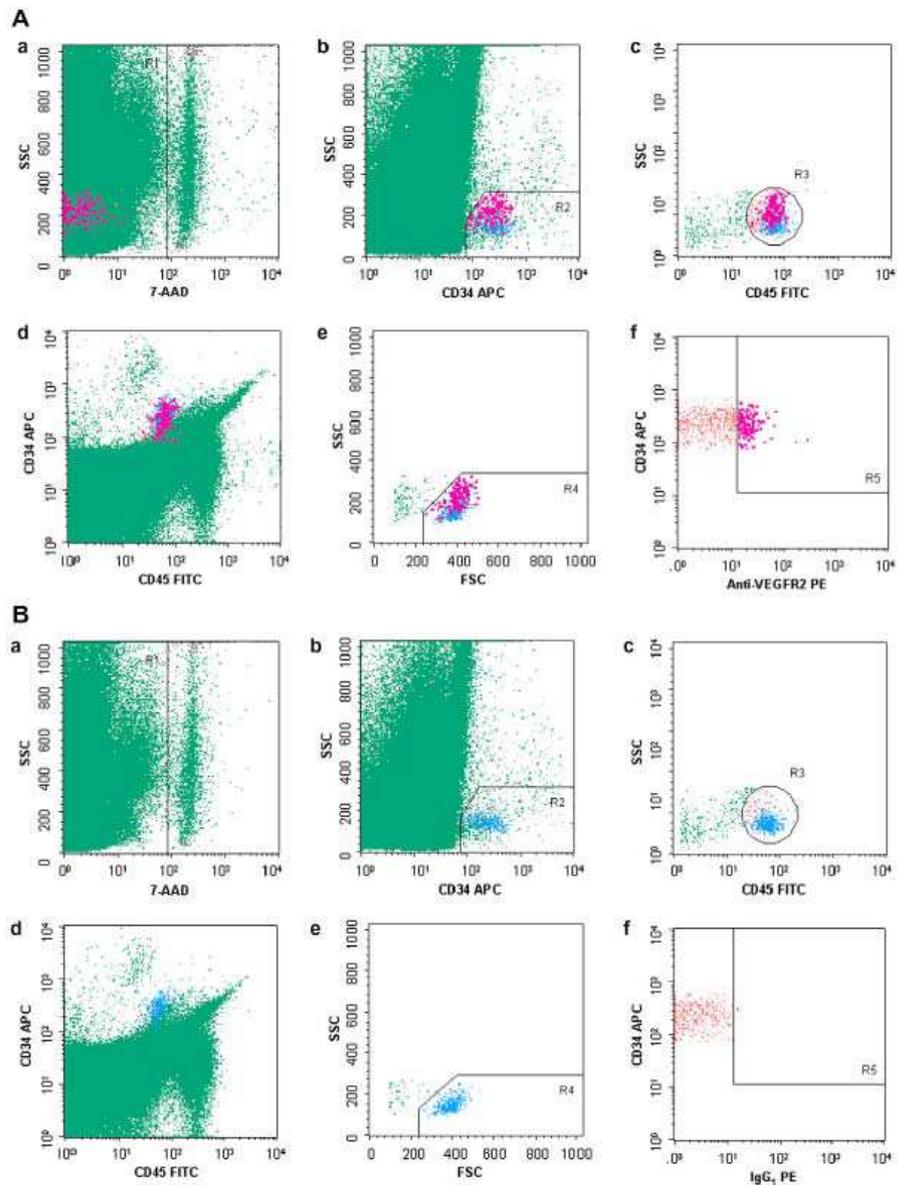


Fig. 1. Flow cytometric detection of circulating $CD45^{dim}CD34^{+}VEGFR2^{+}7AAD^{-}$ progenitor cells in a representative patient. *Fig. 1A*: Analysis of the test ($CD45$ -FITC/ KDR -PE/ $CD34$ -APC/ $7AAD$) tube. $CD45^{dim}CD34^{+}VEGFR2^{+}7AAD^{-}$ progenitor cells are highlighted in bold. (a) selection of viable ($7AAD^{-}$) events (R1 gate); (b and c) gates (R2 and R3) used to select $CD34^{+}$ and $CD45^{dim}$ cells; (d) cells according to $CD34$ and $CD45$ expression; (e) gate (R4) used to exclude debris; (f) gate used to detect $CD45^{dim}CD34^{+}VEGFR2^{+}7AAD^{-}$ cells resulting from crossing R1, R2, R3 and R4 gates. *Fig. 1B*: Analysis of the control PE ($CD45$ -FITC/mouse IgG1-PE/ $CD34$ -APC/ $7AAD$) tube. (a) selection of viable ($7AAD^{-}$) events (R1 gate), 1% of events are shown; (b and c) gates (R2 and R3) used to select $CD34^{+}$ and $CD45^{dim}$ cells; (d) cells according to $CD34$ and $CD45$ expression; (e) gate (R4) used to exclude debris (f) gate used to detect $CD45^{dim}CD34^{+}Ig^{+}7AAD^{-}$ cells resulting from crossing R1, R2, R3 and R4 gates.

to a four-colour flow cytometry (FCM) assay we previously reported.^{19–21} Briefly, ficoll-gradient mononuclear cells were enriched in progenitor cells using the RosetteSep[®] antibody cocktail (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada), then distributed into control and test tubes and treated with Fc receptors (FcR) blocking reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Staining was performed with the following monoclonal antibodies: CD45-FITC (clone T29/33, Dako, Glostrup, Denmark), CD34-APC (clone BIRMA-K3, Dako), KDR-PE (clone 89106, R&D Systems, Minneapolis, MN) and 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA). Antibody batches were titrated rigorously to determine optimal dosage and in order to not be used in excess, except KDR-PE which was used according to the manufacturer's recommendations. Control tubes included a control PE tube (CD45-FITC/mouse IgG1-PE/CD34-APC/7AAD) were performed to measure accurately background noise and to adjust the gates precisely. The IgG1-PE reagent was purchased from the same manufacturer and used in the exact same quantity as the KDR-PE. Cells were acquired on a FACSCalibur (BD Biosciences) and data were analysed using CELLQuest 3.2 software (BD Biosciences) (Fig. 1). Results were expressed as the percentage of VEGFR2⁺ cells among circulating CD34⁺ progenitor cells (CD45^{dim}CD34⁺7AAD⁻ and CD45⁻CD34⁺7AAD⁻ cells).

2.3. Measurement of CECs

CECs were measured in 1 mL whole blood by four-colour FCM according to a method we established previously.⁸ Briefly, immunofluorescent staining was performed with the following monoclonal antibodies: CD31 FITC (clone WM59, BD Pharmingen, NJ, United States of America (USA)), CD146 PE (clone P1H12, BD Pharmingen), CD45 APC (clone T29/33, Dako). An IgG-PE control was performed in 0.5 mL of whole blood (CD45-APC/CD31-FITC/mouse IgG1-PE/7AAD) to measure background noise and to adjust the gates precisely. To ensure statistical analysis, all of the cells contained in the IgG-PE control tube and in the CEC test tube were acquired, representing approximately 2.5×10^6 events and 5×10^6 events, respectively. Data were analysed using CELLQuest 3.2 software (BD Biosciences). Using this method, we found that median CEC levels were 6.5/mL (0–15/mL) in healthy adults and 16.0/mL (0–179/mL) in patients with metastatic carcinoma ($p < 0.001$).⁸

2.4. Statistical analysis

OS was calculated from the initiation of phase 1 treatment to the date of death or the last follow-up (censored data). Progression-free survival (PFS) was

calculated from the start of treatment to the date of disease progression, death, or the last follow-up (censored data). OS and PFS rates were estimated using the Kaplan–Meier method for survival curves. The relationships between survivals and the different markers were tested using the log-rank test. The hazard ratios yielded by the Cox model are presented. All tests were two-sided and a p value < 0.05 was considered statistically significant. The statistical analysis was performed using SAS software version 9.1.

3. Results

3.1. Patients characteristics

Pre-treatment CEC and circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels were measured respectively in 71

Table 1
Patient characteristics ($n = 71$).

Characteristics	N	%
Age		
Median (yrs)	50	
Range (yrs)	21–78	
Sex		
Female	29	41
Male	42	59
ECOG (PS)		
0	28	39
1	42	60
2	1	1
LDH level		
<250 UI/L	45	63
≥250 UI/L	26	37
Albumin level (1 missing)		
<35 g/L	30	43
≥35 g/L	40	57
Number of metastatic site		
0 or 1	20	28
≥2	51	72
RMH score (1 missing)		
0	15	21
1	31	44
2	23	32
3	1	1
Antiangiogenic or antivascular therapy		
Vascular disrupting agents (VDA)	38	54
Dual HER1-2 and VEGFR2 TKI	22	31
VEGFR TKI	11	15
Tumour types		
NSCLC	12	17
Renal cancer	7	10
Colon cancer	7	10
Others	45	6

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; RMH score, Royal Marsden Hospital score; HER, human epidermal receptor; VEGFR, vascular endothelial growth factor; NSCLC, non small cell lung cancer; TKI, tyrosine kinase inhibitors.

and 58 patients, for whom clinical characteristics are shown in Table 1. Sixty-eight patients had metastatic disease and three patients had a locally advanced tumour. All these patients received previously standard chemotherapy regimens, and patients had a median of three prior systemic therapies (range, 1–7). The most common primary tumours were lung cancer (17%), renal cancer (10%), and colon cancer (10%). The most common sites of metastasis were lymph nodes ($n = 30$, 42%), lung ($n = 48$, 68%), liver ($n = 27$, 38%) and bone ($n = 14$, 20%). Twenty-five (35%) patients had more than two metastatic sites (median 2, range 0–6). Baseline biochemistry showed decreased albumin levels (albumin < 35 g/L) in 30 (42%) patients, and LDH levels greater than the ULN (> 250 UI/L) in 26 (37%) patients. Fifteen (21%) patients had a RMH score of 0, 31 (44%) patients had a RMH of 1 and 24 (33%) had a RMH ≥ 2 (one missing data).

3.2. Trial characteristics

During the 4-year study period, all patients included were treated within one of five anti-angiogenic or anti-vascular phase I trials (Table 1). The novel drugs evaluated included vascular endothelial growth factor (VEGFR) small molecule/tyrosine kinase inhibitors in 15% of cases, dual human epidermal receptor 1-2 (HER1-2) and VEGFR2 small molecule/tyrosine kinase inhibitors in 31% of cases and anti-vascular (also referred to as vascular disrupting agent (VDA)) agents in 54% of cases.

3.3. Baseline levels of CEC and circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor cells

For all 71 patients, the median baseline absolute count of CECs was 12/ml (range 0–154/ml). The membrane expression of VEGFR2 (KDR) was examined at baseline in both CD45^{dim}CD34⁺7AAD⁻ and CD45^{dim}CD34⁺7AAD⁻ progenitor cell subsets of 58 patients. The CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺7AAD⁻ subset

was undetectable ($< 0.005\%$ of circulating CD34⁺ progenitor cells). However, the median value of the CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺7AAD⁻ subset represented 1.3% (range 0–32.5%) of circulating CD34⁺ progenitors (Fig. 1). Univariate analysis indicated that there was no clear association between CEC and CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels and the number of metastatic sites or RMH score (data not shown).

3.4. Association of CEC and circulating VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels with outcome

During the median follow-up period of 21.5 months (range 0–39 months), 45 patients died and 66 patients had disease progression. The median PFS was 2.7 months (95% confidence interval (CI), 2–3.9 months) and the median OS was 10 months for the entire cohort (95% CI, 7.6–13.3 months). Univariate analysis revealed no association between the levels of CEC and of circulating VEGFR2-BMD progenitor cells, and PFS (data not shown). A worse outcome was associated with an elevated level of CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells (hazard ratio (HR) 2.0, 95% CI = [1.04–4.1], $p = 0.03$) and a RMH score higher than 0 (HR 2.9, 95% CI = [1.1–7.4], $p = 0.02$) (Table 2). The risk of death was significantly increased in patients who had a prognostic RMH score greater than 0 as compared to patients who had a score equal to 0 (median OS 9.0 months versus 24.2 months, respectively) (Fig. 2) and in patients who had increased CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels ($> 1\%$) as compared to those who had lower values (median OS 17.0 months versus 9.0 months, respectively) (Fig. 3). In the multivariate analysis, only the level of CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells was associated significantly with risk of death (HR = 2.3, 95% CI, 1.1–4.6, $p = 0.02$) (Table 2). We did not observe a relationship between CEC levels and outcome (Table 2). We developed a composite score combining the RMH score with CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺

Table 2
Univariate and multivariate analysis of prognosis factors on overall survival.

Characteristics	N	Median OS		Univariate analysis			Multivariate analysis		
		Months	95% CI	HR	95% CI	P*	HR	95% CI	P*
RMH score (Group)	0	15	24.2	(11.7–38.6)	1		1		
	1-2-3	55	9.0	(7.0–10.1)	2.9	(1.1–7.4)	0.02	3.9	(0.92–16.3)
CEC (/mL)	≤ 20 /mL	51	10.0	(6.9–13.3)	1				
	> 20 /mL	19	18.9	(7.1–38.0)	0.6	(0.3–1.4)	0.26		
CD45 ^{dim} CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ progenitors (%)	$\leq 1\%$	27	17	(9.1–18.9)	1		0.03	1	
	$> 1\%$	31	9.0	(3.2–10.8)	2.0	(1.04–4.1)		2.3	(1.1–4.6)
Combined score	0-1	21	18.4	(8.4–38.0)	1				
	2-3-4	36	9.0	(5.3–10.0)	2.6	(1.2–5.8)	0.02		

OS, overall survival; RMH score, Royal Marsden Hospital score; CEC, circulating endothelial cells; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.
* Logrank test.

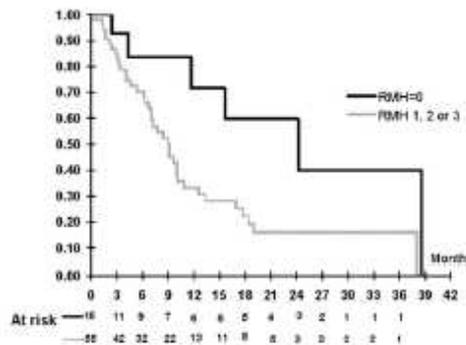


Fig. 2. Kaplan-Meier curves of overall survival stratified according to the Royal Marsden Hospital (RMH) score.

progenitor cell levels. As a majority of patients (31/58) had CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels greater than 1% of circulating CD34⁺ progenitors, this combined CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell

level/RMH score was calculated by adding one point to the RMH score when the CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell level was greater than 1%, and not adding a point otherwise (combined RHM score = RMH score if CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels <1%). The risk of death was significantly increased in patients with a combined CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels/RMH score at least equal to 2 as compared to patients with score equal to 0 or 1 (median OS 9.0 months *versus* 18.4 months respectively, HR = 2.6 (95% CI, 1.2–5.8, *p* = 0.02)) (Table 2) (Fig. 4).

4. Discussion

In the present exploratory, we investigated a novel biological paradigm, – whether cells from the tumour microenvironment such as VEGFR2⁺-BMD progenitor cells and CECs-, could inform on the prognosis given the role of these cells in neoangiogenesis and tumour metastasis. Interestingly, a significant association between VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels and

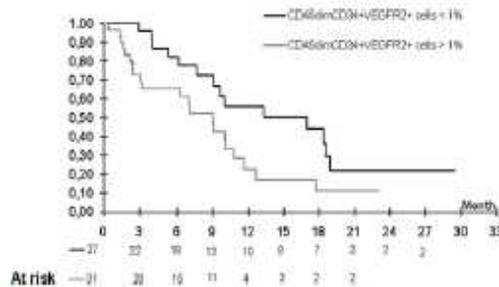


Fig. 3. Kaplan-Meier curves of overall survival stratified according to pre-treatment levels of CD45^{dim}CD34⁺ VEGFR2⁺ progenitor cells.

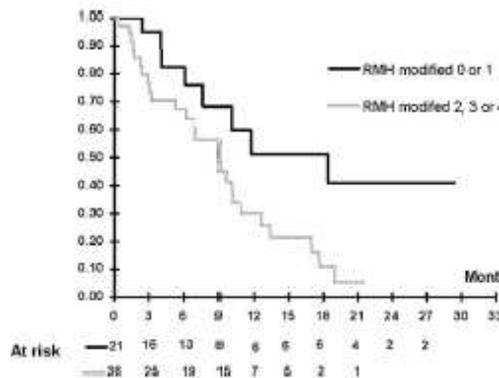


Fig. 4. Kaplan-Meier curves of overall survival stratified according to the composite score combining the the Royal Marsden Hospital (RMH) score and pre-treatment CD45^{dim}CD34⁺ VEGFR2⁺ progenitor cell levels.

the risk of death was observed in a cohort of patients included in phase I trials suggesting that this marker might indeed reflect a general aggressive tumour-behaviour, and may help to better identify candidates for phase I trials.

During tumour growth, local hypoxic conditions trigger the mobilisation and recruitment to sites of neo-vascularisation of a heterogeneous population of BMD cells, which include haematopoietic and endothelial progenitors and immune modulatory cells.^{1,4,5} Among BMD progenitor cells, CEP were initially reported to directly incorporate the endothelial layer of tumour neovessels.⁵ Subsequent studies have proposed a pivotal role for these cells in promoting progression of micro-macro-metastases in murine models.⁶ Although conflicting results have questioned the exact role of CEP,^{2,3} all of the studies agreed on the critical and complementary role of BMD cell populations in supporting tumour growth and promoting metastasis development and dissemination. In humans, the identification of CEPs is complex because of the extreme rarity of these cells, the important phenotypical overlap with haematopoietic progenitors and the absence of standard assay for functional characterisation.² In light of this, the specific sub-population investigated herein was referred to BMD-VEGFR2⁺ cells rather than CEP. In previous studies, we explored VEGFR2⁺-BMD progenitor cell subsets in the blood of patients with metastatic cancer by using a rigorous four-colour FCM assay that, in accordance with recommendations for the identification of extremely rare cells, included sampling of an important volume of blood (10 mL), a pre-enrichment step in progenitor cells, use of a viability marker (7AAD) and a multiple gating strategy.^{19–21} In a small series of phase I cancer patients, we previously observed that CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells were mobilised in high levels in response to acute tumour insult and severe hypoxia induced by a treatment combining an anti-vascular agent (VDA) with chemotherapy.¹⁹ Recently, we reported an association between high pre-treatment CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells levels and poor PFS and OS in a cohort of 55 metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors (TKI) thus supporting the potential utility of this progenitor cell subset to predict the outcome in TKI treated mRCC patients.²¹ In our series of patients receiving different anti-angiogenic or anti-vascular agents in phase I trials, high baseline CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels were associated with a higher risk of death regardless of tumour type and previous treatment. High levels of circulating CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells might reflect a general aggressive tumour-behaviour and associated tumour hypoxia-driven processes that orchestrate their recruitment to sites of neoangiogenesis and possibly their catalytic role in metastatic tumour

growth.²⁰ This hypothesis of 'tumour aggressiveness' would support its prognostic value in patients and would render VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels a universal marker of poor prognosis, not only restricted to anti-vascular or anti-angiogenic treated patients. The prognostic value of VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels in our population of patients enrolled in phase I trials may be extrapolated to other phase I patients, and this hypothesis must be validated in a large prospective cohort of patients with advanced cancer.

Alternatively, pre-treatment VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels might be targeted by anti-vascular agents or anti-angiogenic agents undergoing phase I evaluation. In this respect, VEGFR2⁺-BMD progenitor cell level measurement might help to select patients eligible for such targeted trials and might inform on the differential impact of such treatments, thereby offering a predictive value. Angiogenesis TKI might exert their antitumour effect in part through the suppression of these cells. In contrast, anti-vascular agents leading to massive disruption of the established tumour vasculature would cause increases in BMD progenitors mobilised for vascular repair, as observed in experimental models²⁴ as well as in human patients.²¹ Because anti-vascular agents and anti-angiogenic agents are expected to have different impacts on VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels and because we observed high levels correlated with OS regardless of treatment, the hypothesis of a prognostic rather than a predictive value of these cells in our phase I patient population, seems to be privileged here.

Retrospective studies have attempted to identify clinical prognostic factors to help select patients for phase I trials according to their life expectancy. Such prognostic factors include the performance status, the number of metastatic sites and lymphopenia.^{13–17} The Royal Marsden Hospital (RMH) Phase I Unit developed and prospectively validated a simple clinical prognostic score based on three parameters and demonstrated that low serum albumin (<35 g/L), high serum LDH (>ULN) and >2 metastatic sites were independent prognostic factors in multivariate analysis. The number of poor prognostic variables in patients was expressed as a RMH score ranging from 0 to 3.¹⁸ More recently, the same group developed a new score which included baseline circulating tumour cell (CTC) counts and allowed to identify a group of patients with a worse prognosis and a median OS of 13 weeks (95% CI 12–15 weeks).²³ In our present study, we observed a significant association between CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cell levels and the risk of death in our cohort which remained significant in the multivariate analysis which included the RHM score. Moreover, we created a single composite score that was strongly correlated with outcome and could easily be used by clinicians. Our results suggested that measurements of VEGFR2⁺-BMD

progenitor cell levels when combined to classical clinical and biological parameters could provide a new tool which may have the advantage of being easier to use by oncologists than the RMH score and % VEGFR2-BMD progenitor levels considered independently for selecting candidates for in phase I trials. The association of the level of VEGFR2⁺-BMD progenitor cells to the RMH score, or the composite score alone, may offer better insight to clinicians in order to stratify patients according to their OS for participation or not in phase I studies. In particular, patients with a better OS might be candidates for personalised therapeutic alternatives in early clinical trials.

The incorporation of predictive/prognostic biomarkers in early clinical anticancer drug evaluation is expected to improve the development of new drugs.^{25–27} Circulating BMD progenitors (including CEP) and CEC measurements have raised considerable interest as candidate biomarkers to predict the efficacy of anti-angiogenic treatments in phase II studies.^{28,29} Studies have described high pre-treatment levels of CD45^{dim}CD34⁺CD133⁺ progenitor cells (a phenotype of haematopoietic progenitor cells) correlated with a worse outcome in cancer patients treated by TKIs^{30,31} while conflicting data on CEC and cells referred to as CEP were reported.^{29,32,33} In the present study, no association between CEC levels and outcome was observed. Whether our method lacks sensitivity or our cohort is too small to discriminate different patient outcomes or whether the mechanisms leading to high levels of CEC are not relevant in the present patient population remains an open question. Furthermore, although not statistically significant, patients with high CEC levels had an OS longer than patients with low CEC levels. This finding could appear contra-intuitive as high CEC levels (without evidence of vascular disease or damage) might reflect a high rate of remodelling and turnover of the tumour endothelium and might therefore be considered as a biological marker of tumor aggressiveness. On the other hand, one can also hypothesise that tumours from these patients (with high CEC levels) might be more sensitive to agents targeting the tumour vasculature such as VDA or antiangiogenic drugs. According to this latter hypothesis, patients with high CEC levels might benefit more from the treatment. Finally, current research has evidenced that BMD progenitor cells may play a role in tumour angiogenesis-driven escape mechanisms such as resistance to standard cytotoxic chemotherapy or resistance to anti-vascular agents through hypoxia-driven processes.³⁴ Whether subpopulations of BMD progenitors may also act as biomarkers of resistance to these treatments, offers an attractive perspective for further research.

The present exploratory study investigated the hypothesis that host-related markers from the tumour environment, and in particular those related to

tumour-hypoxia driven mechanisms possibly reflecting tumour aggressiveness in patients resistant to standard cytotoxic chemotherapies, would be correlated to outcome in patients bearing aggressive tumours included in phase I trials. We observed that high baseline VEGFR2⁺-BMD progenitor cell levels were associated with worse prognosis and could additionally provide complementary information to classical clinical and biological parameters for medical oncologists concerned about OS in patient selection. Further prospective studies are needed to confirm these results in a larger population of phase I patients. Our data suggest a new biological prognostic tool of clinical utility for patients with aggressive advanced tumours which could be targeted by new anti-angiogenic therapies.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

The authors acknowledge Fanny Billiot, Nadege Vimond, Nathalie Jacques for expert technical assistance.

References

- Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell* 2008;13:181–3.
- Yoder MC, Ingram DA. Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neovascularization in the murine system. *Curr Opin Hematol* 2009;16:269–73.
- Purhonen S, Palm J, Rossi D, et al. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6620–5.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194–201.
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 2007;21:1546–58.
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008;319(S860):195–8.
- Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005;93:228–35.
- Jacques N, Vimond N, Conforti R, et al. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 2008;337:132–43.
- Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost* 2006;96:45–52.
- LoRusso PM, Boerner SA, Seymour L. An overview of the optimal planning, design, and conduct of phase I studies of new therapeutics. *Clin Cancer Res* 2010;16:1710–8.

11. Chen EX, Tannock IF. Risks and benefits of phase I clinical trials evaluating new anticancer agents: a case for more innovation. *JAMA* 2004;292:2150–1.
12. Roberts Jr TG, Goulart BH, Squitieri L, et al. Trends in the risks and benefits to patients with cancer participating in phase I clinical trials. *JAMA* 2004;292:2130–40.
13. Bachelot T, Ray-Coquard I, Catimel G, et al. Multivariable analysis of prognostic factors for toxicity and survival for patients enrolled in phase I clinical trials. *Ann Oncol* 2000;11:151–6.
14. Italiano A, Massard C, Bahleda R, et al. Treatment outcome and survival in participants of phase I oncology trials carried out from 2003 to 2006 at Institut Gustave Roussy. *Ann Oncol* 2008;19:787–92.
15. Han C, Braybrooke JP, Deplanque G, et al. Comparison of prognostic factors in patients in phase I trials of cytotoxic drugs vs new nontoxic agents. *Br J Cancer* 2003;89:1166–71.
16. Wheeler J, Timberidou AM, Hong D, et al. Survival of patients in a phase I clinic: the M.D. Anderson cancer center experience. *Cancer* 2009;115:1091–9.
17. Penel N, Vanseymortier M, Bonnetterre ME, et al. Prognostic factors among cancer patients with good performance status screened for phase I trials. *Invest New Drugs* 2008;26:53–8.
18. Arkenau HT, Barriuso J, Olmos D, et al. Prospective validation of a prognostic score to improve patient selection for oncology phase I trials. *J Clin Oncol* 2009;27:2692–6.
19. Farace F, Massard C, Borghi E, et al. Vascular disrupting therapy-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *Ann Oncol* 2007;18:1421–2.
20. Taylor M, Rösler J, Georger B, et al. High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2009;15:4561–71.
21. Farace F, Gross-Goupil M, Tournay E, et al. Levels of circulating CD45(dim)CD34(+)VEGFR2(+) progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 2011;104:1144–50.
22. Malka D, Boige V, Jacques N, et al. Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol* 2011.
23. Olmos D, Baird RD, Yap TA, et al. Baseline circulating tumor cell counts significantly enhance a prognostic score for patients participating in phase I oncology trials. *Clin Cancer Res* 2011;17(11):1–9.
24. Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, et al. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 2008;14:263–73.
25. Andre F, Delaloge S, Soria JC. Biology-driven phase II trials: what is the optimal model for molecular selection? *J Clin Oncol* 2011.
26. Carden CP, Sarker D, Postel-Vinay S, et al. Can molecular biomarker-based patient selection in Phase I trials accelerate anticancer drug development? *Drug Discov Today* 2010;15:88–97.
27. Yap TA, Sandhu SK, Workman P, de Bono JS. Envisioning the future of early anticancer drug development. *Nat Rev Cancer* 2010;10:514–23.
28. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:626–35.
29. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006;6:335–45.
30. Vrolijk L, Lind JS, de Haas RR, et al. CD133+ circulating haematopoietic progenitor cells predict for response to sorafenib plus erlotinib in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2010;102:268–75.
31. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, et al. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2009;27:3027–35.
32. Stribos MH, Kraan J, den Bakker MA, et al. Cells meeting our immunophenotypic criteria of endothelial cells are large platelets. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:86–93.
33. Stribos MH, Gratama JW, Kraan J, et al. Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises. *Br J Cancer* 2008;98:1731–5.
34. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592–603.

IV. Discussion

Notre travail a permis de mettre en évidence qu'un taux élevé de CEP est associé à une survie globale défavorable dans une population de patients sélectionnés et traités dans des protocoles de phase I. Cette étude montre aussi que le taux de CEP est un facteur pronostique indépendant des facteurs cliniques validés pour la survie globale en analyse multivariée, et pourrait donc être utilisé pour une meilleure sélection des patients pour une inclusion en essais de phase I. De plus, cette étude suggère que l'utilisation de biomarqueurs circulants peu invasifs pourrait être incorporée dans les essais précoces pour évaluer le pronostic des patients, mais aussi pour permettre de mettre en évidence un premier signal d'activité antitumorale ou permettre de faire la preuve du concept de l'action d'une nouvelle thérapie ciblée.

IV.1 Facteurs pronostiques de survie des patients atteints de cancer inclus en essais précoces

Toute proposition thérapeutique est fondée sur la discussion entre le médecin et son patient du bénéfice et du risque d'un traitement en fonction du pronostic de la pathologie. Cette question est particulièrement importante dans la discussion avec le patient avant une inclusion en phase I (Kurzrock et al, 2013 ; Daugherty et al, 1999). Dans cette situation très particulière, des patients se voient proposer l'administration d'un agent potentiellement efficace et une prise en charge renforcée, alors même qu'ils sont en situation de limitation thérapeutique. Dans ces essais de phase I, qui jouent un rôle crucial dans le

développement de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses, le pourcentage de bénéfice et d'effets secondaires du traitement ne peut être décrit précisément comme dans le contrat habituel entre le médecin et le malade. Même si le bénéfice clinique potentiel pour un patient d'une participation à un essai de phase I peut être argumenté en particulier en ce qui concerne certaines thérapies ciblées, il n'en reste pas moins qu'il est indispensable d'évaluer le pronostic des patients. Compte tenu de l'incertitude de la balance bénéfice-risque particulier aux protocoles de phase précoce, il est reconnu que les patients ayant une espérance de vie inférieure à 90 jours doivent être exclus de ces essais (Ploquin et al, 2012). En premier, il ne paraît pas éthique et médicalement raisonnable de proposer à des patients qui ont un risque élevé de décès précoce dans les 3 mois de subir des procédures lourdes de suivi avec ou sans bénéfice direct. De plus, l'inclusion de patients qui décèdent rapidement dans des protocoles qui testent de nouveaux médicaments risque de faire perdre des informations importantes sur l'efficacité du médicament ou sur des toxicités chroniques. Enfin, l'inclusion de patients avec un bon état général permet de pouvoir déterminer au mieux les toxicités nouvelles en relation avec le nouveau médicament par rapport à l'évolution de la maladie tumorale. Toutes ces raisons expliquent que plusieurs groupes ont développé différentes approches pour déterminer des scores pronostiques basés sur des critères purement cliniques, biologiques, ou moléculaires.

L'ensemble des protocoles de recherches intègre un critère d'inclusion avec une espérance de vie de plus de 3 mois comme un pré requis à tout protocole thérapeutique dans les essais de phase I, mais aussi dans des essais plus

tardifs et ceci reste valable dans la pratique des soins standard. Cependant, il est à noter qu'il n'existe pas de consensus clair sur la méthode pour définir au mieux un pronostic défavorable. Plusieurs études ont montré que le sens commun médical est souvent pris en défaut pour évaluer le risque de décès des patients atteints de cancers avancés (Robert et al, 2004 ; Horstmann et al, 2005). Plusieurs groupes ont développé des scores pronostiques qui ont été récemment comparé dans une revue récente (Ploquin et al, 2012) (Tableau 8). Plus d'une dizaine d'études ont été ainsi conduites pour déterminer les facteurs cliniques corrélés à la survie globale ou au décès précoce (dans les 3 mois), et ont ainsi identifié plusieurs variables en analyses multivariées. Seulement 2 modèles pronostiques ont été validés prospectivement sur des cohortes indépendantes (Arkenau et al, 2009 ; Penel et al, 2010).

L'équipe du Royal Marsden Hospital (RMH) a publié une première étude rétrospective dans une population de 212 patients traités en phase I par des TMC pour déterminer leur devenir. Cette étude a identifié en analyse multivariée 3 facteurs pronostiques importants : taux d'albumine, taux de LDH et le nombre de site métastatique. A partir de ces 3 variables, un score a été établi pour déterminer la survie globale des patients. Ainsi, les patients avec un score de 0-1 avaient une survie globale de 74,1 semaines, alors que les patients ayant un score de 2-3 avaient une survie de globale de 24,9 semaines (Arkenau et al, 2008). Ce score a été ensuite validé prospectivement sur une cohorte de 78 patients inclus en phase 1 dans l'unité de phase 1 du RMH (Arkenau et al, 2009) (Tableau 9).

Tableau 8: Facteurs pronostiques de survie identifiés dans les principales études rétrospectives et prospectives pour les patients inclus en phase 1 (adapté de Ploquin et al, 2011)

ETUDES & TYPES	N de PATIENTS	SCORE
Janisch et al, 1994 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	349	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PS ▪ Plaquettes > 321000 ▪ Albumine < 39g/L ▪ Cancers non urologiques
Yamamoto et al, 1999 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	82	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECOG > 2 ▪ Perte de poids ▪ > ou égal à 2 sites métastatiques
Bachelot et al, 2000 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	154	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PS > ou égal à 2 ▪ LDH > 600 UI/L
Han et al, 2003 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	420	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PS > 1 ▪ 2 sites métastatiques ▪ Hyperleucocytose ▪ Hémoglobine < 12g/dl ▪ LDH > N
Penel et al, 2008 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	156	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lymphocytes < 700/mm³ ▪ Albumine < ou égal 38g/l
Arkenau et al, 2008 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	212	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Plus de 2 sites métastatiques ▪ LDH > N ▪ Albumine < 35g/l
Arkenau et al, 2009 <i>Prospective, monocentrique</i>	72	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Validation du score
Wheler et al, 2009 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	200	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Histoire de thrombose ▪ Métastases hépatiques ▪ Plaquettes > 440 000/mm³
Penel et al, 2010 <i>Multicentrique, monocentrique</i>	257	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lymphocytes < 700/mm³ ▪ Albumine < ou égal 38g/l
Italiano et al, 2008 <i>Rétrospective, monocentrique</i>	180	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Temps entre le diagnostic et l'inclusion ▪ Contrôle de la maladie

Ces études ont donc montré qu'il est possible de déterminer le pronostic des patients inclus en phase 1. Cependant, ces différentes études ont inclus peu de patients et le plus souvent sont le fruit d'une expérience monocentrique. Récemment pour répondre à ces limites, une étude rétrospective européenne conduite par the European New Drug Development Network a été publiée pour permettre de valider sur un grand nombre de malades, les différents scores pronostiques (Olmos et al, 2012). Cette étude a inclus 2182 patients traités dans une étude de phase 1 de 2005 à 2007 dans 14 centres de phase I en Europe. Le premier objectif de cette étude était de valider un score pronostique de la mortalité à 90 jours. Ainsi, 8 variables ont été identifiées comme étant corrélées à la survie à 90 jours : performance status (PS), albumine, lactate deshydrogenase (LDH), phosphatase alcaline (PAL), nombre de site métastatique, taux de croissance tumorale, taux de lymphocyte et de globules blancs. Deux scores pronostiques ont été proposés, mais qui ne permettent pas de mieux prédire la survie à 90 jours que le score du RMH.

Dans notre étude, nous avons pu montrer que le score du RMH avait une valeur pronostique importante en analyse univariée et multivariée, et que le taux de CEP a une valeur pronostique indépendante au score du RMH. Il est ainsi possible de proposer un score composite qui pourrait aider à mieux sélectionner les patients inclus en phase 1 : soit à exclure les patient ayant un pronostic défavorable à court terme (score RMH 2-3 et/ou taux de CEP >1%), ou à l'inverse proposer une prise en charge adaptée aux patients ayant paradoxalement une pronostic plutôt favorable (score RMH 0 et/ou taux de CEP <1%).

Tableau 9: Facteurs pronostiques et devenir des patients inclus en phase I et score du RMH (Royal Marsden Hospital) (Arkenau et al, 2008 ; Arkenau et al, 2009)

Variable	Score	HR	Survie globale médiane (semaines)
LDH		1,85	
<Normal	0		
>Normal	1		
Albumine (g/L)		1,83	
>35	0		
<35	1		
Nombre de site métastatique		1,54	
0-2	0		
>2	1		
Score RMH	0-1		33 (24-42)
(Arkenau et al, 2009)	2-3		15,7 (11-21)

Il est possible de mettre en évidence d'autres facteurs pronostiques des patients inclus en phase 1. Ainsi, il a été proposé d'évaluer la corrélation entre la dynamique de croissance tumorale et la survie globale en phase 1 (Carlos-Gomez et al, 2010). Plusieurs études avaient suggéré que la présence d'une croissance tumorale faible lors de l'inclusion d'un patient en phase 1 est un facteur de bon pronostic (Italiano et al, 2006 ; Olmos et al, 2012). Il est possible d'évaluer la courbe de croissance tumorale avant et après un traitement expérimental. L'évaluation radiologique RECIST (Eisenhauer et al, 2009) ne prend pas en compte cette donnée, et peut donc manquer des informations importantes concernant l'activité anti-tumorale d'un médicament. Plusieurs études récentes ont montré qu'un indice de TGR (tumor growth rate) peut permettre de réévaluer l'efficacité de certains médicaments et est de plus un facteur pronostique de survie (Ferte et al, ASCO 2013; Stein et al, 2012).

IV.2 Les biomarqueurs circulants comme facteurs pronostiques en phase 1

Plusieurs modèles pronostiques ont donc été proposés pour définir le pronostic des patients inclus en phase 1. Cependant, ces modèles restent imparfaits et il est important d'essayer d'améliorer ces scores. Compte tenu de l'importance de cette question, il nous est apparu important d'étudier l'intérêt des marqueurs circulants dans le champ du développement des nouvelles thérapies en cancérologie.

IV.2.1 Marqueurs circulants de l'angiogenèse

Les anomalies de l'angiogenèse au cours du processus tumoral sont une des propriétés majeures des cellules tumorales (Hanahan et al, 2001 et 2011). Il est communément admis que les bases conceptuelles de l'angiogenèse tumorale ont été découvertes par le chirurgien J Folkman dans les années 1970 (Folkman, 1971). Ainsi, la progression tumorale est largement dépendante de la formation de nouveaux vaisseaux et du recrutement des cellules endothéliales (Ferrara et al, 2002 ; Carmeliet et al, 2009). Il est clair que le mécanisme de néo-angiogenèse est complexe, et met en jeu un ensemble de facteurs régulateurs, dont les plus importants sont le VEGF et l'angiopoïétine (Carmeliet et al, 2000 ; 2011). Le but de notre travail n'était pas de décrire les mécanismes moléculaires de la néo-angiogenèse mais de prendre parti de son importance dans la croissance tumorale pour déterminer si des biomarqueurs du processus angiogénique pourraient servir pour identifier une population de patients avec un pronostic défavorable. Il est considéré que les CEC sont des marqueurs de l'intégrité vasculaire, et un nombre élevé de CEC a été décrit dans de

nombreuses situations pathologiques comme les maladies cardiovasculaires, les infections, les maladies auto-immunes et les cancers (Dignat-Georges et al, 2003 ; Farace et al, 2007). Les CEC sont des cellules matures qui peuvent se détacher des vaisseaux, entrer dans la circulation sanguine et être le témoin d'un dysfonctionnement de l'endothélium. Son rôle comme potentiel biomarqueur de la néo-angiogenèse a été évoqué par plusieurs études (Bertolini et al, 2006 ; Jubb et al, 2006 ; Ellis et al, 2008). Compte tenu de la difficulté d'isoler les CEC, et de l'absence de consensus sur la meilleure méthode pour isoler les CEC, les résultats concernant leur valeur pronostique et prédictive sont sujet à discussion.

Deux études ont en particulier rapporté des résultats contradictoires en utilisant deux techniques différentes pour quantifier les CEC. Une étude italienne a rapporté que le taux de CEC avait un rôle pronostique et était corrélé avec une survie sans progression courte dans une série de 40 patients atteints de cancer du colon traités par une combinaison de chimiothérapie et de bevacizumab (Ronzoni et al, 2010). A l'opposé, une autre étude n'a pas retrouvé de corrélation pronostique en évaluant les CEC avec la technique CellSearch (Simkens et al, 2010). Dans une étude récente, il a été évalué le rôle pronostique des CEC dans une population de patients atteints de cancer du colon métastatique traités par une chimiothérapie et une thérapie antiangiogénique (bevacizumab) dans le cadre de l'essai randomisé de phase II FNCLCC ACCORD 13/0503 (Malka et al, 2011). Dans cette étude rétrospective, il a été montré que le taux de CEC avant traitement et en cours de traitement était corrélé au taux de réponse et à la survie sans progression de ces patients traités en première ligne. Les patients avec un taux de CEC

élevé avaient une survie sans progression médiane de 7,6 mois par rapport à 9,8 mois pour les patients avec un taux de CEC bas. Il n'existait pas de différence significative pour la survie globale, mais les patients ayant un compte de CEC bas avaient une survie globale de 32 mois versus 19 mois pour les patients avec un compte de CEC haut. Cette étude montre qu'il est possible de monitorer les CEC en utilisant une technique de cytométrie de flux, permettant la capture de cellules circulantes rares, et en choisissant le phénotype de CEC adéquat (CD31+CD146+CD45-7AAD-) (Jacques et al, 2008). Les CEC ont été aussi étudiées dans d'autres pathologies. Une étude néerlandaise a étudié l'intérêt des CTC et des CEC dans les cancers de la prostate résistants à la castration et traités par une chimiothérapie à base de docetaxel (Strijbos et al, 2010). Dans ce travail les auteurs ont pu montrer que les taux de CTC et de CEC détectés à 2-5 semaines étaient corrélés à la survie globale des patients, et qu'il était possible de distinguer 4 groupes de patients avec des survies globales différentes allant de plus de 24 mois à 6 mois de survie globale. De même les CEC et les CTC ont été étudiés dans le cancer du sein métastatique dans une étude biologique du protocole MO19391 (Bidard et al, 2010). Dans cette étude, les patientes étaient traitées par une chimiothérapie associée au bevacizumab. Il est intéressant de noter que dans cette étude le taux de CTC n'est pas corrélé au temps à progression, alors que la variation des CEC est associée au temps à progression. Ainsi, l'intérêt clinique pronostique et prédictif des CEC reste sujet à débat, et il sera probablement nécessaire de développer un consensus sur la méthode de mesure des CEC, et de valider ou non leur intérêt dans de larges cohortes de patients.

L'angiogenèse tumorale et physiologique chez l'adulte a longtemps été vue comme un processus dépendant de la prolifération des cellules endothéliales sous l'effet de la stimulation de différents facteurs de croissance comme le VEGF ou le FGF (Pocard et al, Feije et al, 2010). Des travaux récents montrent que la néo vascularisation chez l'adulte n'est pas exclusivement le résultat de la prolifération de cellules endothéliales matures vasculaires (processus d'angiogenèse), mais peut aussi être la conséquence de la différenciation et de l'incorporation de cellules endothéliales primitives originaires de la moelle osseuse (Asahara et al, 1999 ; Takahashi et al, 1999). Cependant, des travaux ont pu montrer que l'angiogenèse adulte est dépendante en partie de l'incorporation de cellules endothéliales progénitrices (CEP) et de cellules hématopoïétiques progénitrices (CHP) d'origine médullaire (Asahara et al, 1999 ; Asahara et al, 1997). Pour la première fois en 2001, l'équipe de Lyden a montré que le recrutement de cellules médullaires est impliqué dans la néoangiogenèse tumorale (Lyden et al, 2001). Plusieurs études chez la souris ont montré que les cellules angiogéniques d'origine médullaire sont capables de contribuer à la formation de vaisseaux tumoraux (Rafi, Lyden et al, 2002 ; Peters, Diaz, Polyak et al, 2005). Chez l'homme, plusieurs études ont suggéré l'intérêt de l'étude des CEP dans les cancers. Une étude récente a montré que le taux de CEP était plus important chez des enfants atteints de pathologie tumorale maligne métastatique par rapport à des enfants atteints de cancers localisés. Dans une série de 45 enfants malades, avec 23 enfants ayant des tumeurs localisées et 22 enfants ayant des cancers métastatiques, le taux de CEP et de CEC a été mesuré. Il n'existait pas de différence de taux de CEC dans cette population, par contre le taux de CEP était corrélé au statut

métastatique (Taylor et al, 2009). Cette étude suggère donc que les CEP pourraient être un marqueur de l'évolution du processus métastatique. Compte tenu de l'efficacité des thérapies antiangiogéniques dans les cancers du rein à cellule claire, l'intérêt de la mesure des CEC, CEP et de marqueurs circulants a été évalué dans une série de 55 patients ayant un cancer du rein, traités par inhibiteurs du VEGFR. Il n'existait pas de corrélation entre le taux de CEC et la survie des patients, par contre les patients avec un taux de CEP élevé avaient une survie sans progression et une survie globale inférieures aux patients avec un taux de CEP bas (Farace et al, 2011). Ces études montrent des résultats concordants avec nos constatations, et suggèrent que le taux de CEP pourrait être un marqueur de l'évolution tumorale et pourrait être proposé pour mieux définir le pronostic des patients atteints de cancer avancé.

IV.2.2 Autres marqueurs circulants

Nous avons vu en détail dans la première partie de notre travail, que les CTC sont fréquemment détectables chez les patients atteints de cancers métastatiques, en particulier avec l'approche CellSearch®. Comme un taux élevé de CTC détectées par la technique CellSearch® a été aussi corrélé avec un pronostic défavorable dans plusieurs types de pathologies cancéreuses d'origine épithéliale (cancer du sein, de la prostate et du colon en particulier), il était donc intéressant de savoir si le taux de CTC pouvait améliorer la sélection de patients inclus en phase 1. Dans une étude rétrospective, Olmos et al, ont ainsi évalué 128 patients inclus dans un protocole de phase 1 au Royal Marsden Hospital et qui avaient eu lors de ce protocole un taux de CTC avant traitement déterminé par la méthode CellSearch®. Dans cette étude, un taux de

CTC > ou égal à 3 est un facteur pronostique indépendant des facteurs cliniques du score du RMH (Olmos et al, 2011). Une étude de validation est en cours. La détection des CTC chez les patients inclus en phase I peut avoir d'autres applications. Il a été très clairement montré que le nombre de CTC et leurs variations quantitatives, sont des marqueurs indépendants puissants associés à la survie dans de nombreux cancers métastatiques d'origine variée. Ces marqueurs sont évalués avant l'initiation de la thérapie puis lors du traitement (dès deux semaines après le début d'une nouvelle ligne thérapeutique) et sont aussi fortement associés aux réponses observées en imagerie (De Giorgi et al, 2009 ; Olmos et al, 2009). L'équipe du RMH de Johann de Bono a étudié l'association du taux de CTC à la survie dans une cohorte de 119 patients suivis pour un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration et traités dans des protocoles de phase I (Olmos et al, 2011). Cette étude rétrospective retrouve que le taux de CTC a une valeur pronostique, mais montre aussi que la décroissance des CTC est corrélée à la survie sans progression et à la survie globale. Le comptage des CTC semble donc être un marqueur applicable en oncologie indépendamment d'un type tumoral particulier et indépendamment de la stratégie thérapeutique. Une étude prospective multicentrique a été menée à l'Institut Gustave Roussy avec comme hypothèse que le taux de CTC ou l'évolution du nombre de CTC intervient en amont des variations de taille tumorale (selon les critères RECIST). L'objectif principal de cette étude est d'estimer la sensibilité et la spécificité de l'augmentation du taux de CTC (évalué à 1 mois et comparé au nombre de CTC mesuré avant l'initiation du traitement) pour la prédiction des patients progressifs à 2 mois identifiés par le bilan radiologique classique

(critères RECIST) chez des patients atteints d'un cancer métastatique, recevant une thérapeutique anticancéreuse innovante dans le cadre d'un essai thérapeutique de phase 1 (PHRC CTC Phase 1, Annexes). Si cette étude est positive, elle pourrait être un argument pour ajouter le compte des CTC dans les protocoles de phase 1 soit pour déterminer le pronostic des patients à l'inclusion, soit pour détecter un signal d'activité anti tumorale précoce avant les résultats de l'imagerie standard réalisée le plus souvent dans les 2 mois après le début du traitement.

Compte tenu de l'enjeu des essais précoces dans le développement des nouvelles thérapies, il est aussi intéressant d'évaluer des biomarqueurs qui permettent d'enregistrer les premiers signes d'activité antitumorale ou des signes de toxicités. L'inhibition de l'apoptose ou la résistance à la mort cellulaire est un « hallmark » des cellules cancéreuses (Weinstein et al, 2002). Les marqueurs de mort cellulaire ont un intérêt évident dans le suivi de certains protocoles de chimiothérapie, ou dans le développement de nouvelles TMC ciblant les voies de la mort cellulaire (Taylor et al, 2006). L'équipe de C Dive à Manchester a développé depuis plusieurs années différents biomarqueurs circulants pour suivre l'efficacité de différentes molécules en développement. Ainsi, plusieurs biomarqueurs de la mort cellulaire peuvent être évalués dans le tissu tumoral, mais un certain nombre de ces biomarqueurs sont aussi relargués lors de la mort cellulaire et peuvent donc être mesurés de façon répétée et peu invasive chez des patients en cours de traitement (Ward et al, 2008). Ainsi, il est possible de mesurer dans le sang des patients la cytokératine (Briven et al, 2003), les CK18 et 19 (Holdenrieder et al, 2006), des

composés plus spécifique de l'apoptose comme M30 et M65 détectant des formes clivées de CK18 (Kramer et al, 2004). Ces biomarqueurs de la mort cellulaire peuvent donc être utilisés comme des marqueurs du pronostic d'une maladie (Greystocke et al, 2010), ou des marqueurs de preuve du concept d'un effet pharmacodynamique d'un médicament (Cummings et al, 2006 ; Cummings et al, 2010). Dans une étude récente, le taux de CK18 a été étudié dans une cohorte de patients atteints de cancer du colon au stade localisé opéré (97 patients) ou au stade métastatique en cours de chimiothérapie (74 patients). Le taux de CK 18 était un facteur pronostique dans cette population, et l'évolution du taux de CK18 en cours de chimiothérapie était corrélée à une réponse défavorable (Greystoke et al, 2012).

L'ADN circulant (ADNcir) est un autre biomarqueur circulant sanguin qui pourrait avoir un intérêt majeur dans les années à venir. L'ADNcir correspond à de l'ADN double brin qui peut être isolé à partir du plasma et du sérum de patients ou de sujets sains (Mandel et Métais, Biologie 1947). Plusieurs explications ont été évoquées concernant le mécanisme du relargage de l'ADNcir dans la circulation (Schwarzenbach et al., 2011 ; Board. Ann NY Acad Sci 2008 ; Umetani Clin Chem 2006)) : l'apoptose et/ou de la nécrose des cellules cancéreuses ; relargage d'ADNcir par les cellules tumorales par les cellules du stroma ; relargage actif de l'ADNcir par les cellules tumorales elle-mêmes. Comme pour les CTCs, l'intérêt principal d'étudier l'ADNcir est de pouvoir avoir accès à du matériel génétique tumoral d'une manière peu invasive comparativement aux biopsies tumorales: peu contraignant pour le patient, simple pour le personnel médical (prise de sang), permettant des

prélèvements multiples au cours du temps et des différents traitements (Board et al., 2008b ; Lo et al., 1998 ; Alix-Panabieres et al, 2012). A ce jour, plusieurs technologies sont en cours d'évaluation pour permettre la quantification, l'extraction et la caractérisation de l'ADNc. Il est à noter qu'aucune technique standard n'est actuellement recommandée par manque d'étude comparative. L'étude de l'ADNcir impose l'utilisation de techniques sensibles du fait de la très faible concentration de l'ADNcir dans le plasma (de l'ordre de quelque nanogrammes par ml de plasma), et de la proportion importante d'ADNcir issu des cellules normales de l'organisme, engendrant un bruit de fond important. Ainsi, il a été montré qu'il était possible de mettre en évidence des quantités variables d'ADNcir chez des patients atteints de cancer. De plus, il est possible d'utiliser des plateformes de séquençage à haut débit pour analyser l'exome du tissu tumoral, mais aussi l'ADNcir (Leary et al, 2010 ; Van der vaart et al, 2009). Différentes techniques ont été utilisées comme la PCR digitale (Taly et al, 2012), le BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics) (Diehl et al, 2006 et 2008; Li et al, 2006). Cette dernière technique a été utilisée pour détecter des mutations du gène *EGFR* dans des cancers du poumon (Taniguchi et al, 2011), des mutations du gène *KRAS* dans le cancer du colon (Diehl et al, 2005 ; Holdhoff et al, 2009), des mutations du gène *PI3KCA* dans les cancers du sein (Higgins et al, 2012). Une autre technique utilise une PCR appelée ARMS (Amplification Refractory Mutation System) en association avec des sondes spécifiques dites « Scorpions », et a montré des résultats performants dans la détection de mutations dans l'ADNcir dans les cancers du sein, du poumon et le mélanome (Board et al, 2008 ; Board et al, 2009). Une étude a étudié la faisabilité, la sensibilité et la spécificité d'une plateforme de

spectrométrie de masse (Sequenom), peut détecter des mutations (un panel de 238 mutations parmi 19 oncogènes ; Oncocarta) (Van Puijenbroek et al, J MOL Diagn 2005 ; Fumagalli et al, 2010 ; MacConail et al, 2009) à partir du tissu tumoral et du sang de 105 patients inclus dans des protocoles de phase 1 dans l'unité DDU du Royal Marsden Hospital (Perkins et al, 2012). La concentration médiane de l'ADNcir calculée par Picogreen était de 17 ng/ml de plasma (0,5-1600 ng/ml), pour une valeur de 6,5 ng/ml de plasma chez les volontaires sains (4,5-13,3 ng/ml), avec de grandes variations en fonction du type tumoral (7ng/ml de plasma pour les patients atteints de mélanome et 53ng/ml de plasma pour les patients atteints de cancer de la prostate). Cette étude a montré que le taux d'ADNcir était pronostique de la survie globale des patients en analyse multivariée, et qu'il y avait une corrélation entre le taux d'ADNcir et le score du RMH. De plus, il existait une corrélation importante entre les mutations détectées dans la tumeur et celles détectées dans le sang des patients. D'autres études ont montré que l'ADNcir apparaissait comme un meilleur marqueur pronostique que les CTC dans des cancers du sein métastatiques, et précédait de plusieurs mois la progression radiologique dans les cancers du sein ou du colon (Dawson et al, 2012_2013 ; Misale et al, 2012 ; Diaz et al, 2012 ; Murtaza et al, 2013).

Ces études suggèrent fortement que l'ADNcir pourrait devenir un outil pour rechercher des mutations dans le sang des patients, et suivre l'évolution de certaines mutations au cours du temps (Schwarsenbach et al, 2008 ; de Mattos-Arruda et al, 2011 et 2013 ; Pantel et al, 2013).

IV.3 Perspectives pour les essais précoces basés sur une cancérologie moléculaire

Nous avons vu que les phases précoces du développement clinique ont pour but de définir les doses, d'étudier la tolérance et de détecter des signaux d'efficacité. Une des questions clés à la fin d'un programme précoce de développement d'un médicament est de savoir si ce même traitement présente des signes d'efficacité. Une voie possible pour obtenir une réponse rapide à la question de l'efficacité du médicament consiste à enrichir la population en patients présentant une anomalie moléculaire spécifique. Plusieurs protocoles de « sélection » moléculaire sont aujourd'hui en cours dans le monde (protocole SAFIR, MOSCATO, SHIVA, WINTHER...) avec le but de mieux caractériser la pathologie tumorale chez un patient donné à l'aide de différentes technologies, dans le but d'identifier une anomalie qui pourrait être la cible d'une thérapie spécifique, et éventuellement traiter un patient dans le cadre d'un protocole clinique, ou dans le cadre d'un programme d'accès aux nouvelles thérapies (ATU, programme AcSé...).

Le but de ces protocoles est d'utiliser les analyses moléculaires à haut débit (le CGH array et le séquençage) pour traiter les patients porteurs de cancer métastatique avec des thérapies ciblées et d'évaluer le bénéfice clinique chez les patients ayant pu être traités par une thérapie ciblée sur les anomalies moléculaires identifiées (Massard et al, EORTC NCI 2012). Ces programmes de médecine dite « personnalisée » ou « moléculaire », ont pour objectif à long terme d'augmenter la rentabilité du processus de développement thérapeutique

en essayant d'identifier dans la pratique clinique les patients qui seraient atteints de cancers portant des anomalies moléculaires susceptibles de répondre à un traitement donné. Dans le cadre de ces programmes, le développement de marqueurs non invasifs pour le diagnostic ou le suivi des traitements est un objectif important (Attard et al, 2012). En effet, il est relativement facile de réaliser une biopsie tumorale pour déterminer une analyse moléculaire une fois, et il est probable que les biomarqueurs circulants (CTC ou ADNcir) ne remplaceront pas l'analyse d'une biopsie d'un tissu tumoral. Cependant, il est relativement difficile de répéter ce type de mesures invasives chez les patients, et il semble impossible de vouloir proposer plus de 3 ou 4 biopsies à des patients au cours de l'évolution de leur cancer. Les anomalies moléculaires somatiques recherchées seront celles connues pour la tumeur primitive du patient (amplification de gène, mutation somatique associée à la sensibilité ou à la résistance aux thérapies, translocation chromosomique à l'origine d'une protéine de fusion oncogénique). A titre d'exemple, nous rechercherons dans les CTC de tumeurs bronchiques la présence d'amplification et/ou de mutations d'EGFR, d'amplification de cMET, la présence de mutation somatique du domaine tyrosine kinase et la présence de mutation somatique de KRAS. Dans le cas des tumeurs prostatiques, la caractérisation moléculaire pourra aussi correspondre à la recherche de translocation associant le gène TMPRSS2 à l'un des gènes de la famille Ets (ERG, ETV1 et ETV4) (Stott et al, 2010).

Les biomarqueurs non invasifs circulants pourraient permettre : en premier de faire un suivi d'une anomalie moléculaire déterminée sur une biopsie, de

déterminer si la thérapie ciblée est efficace, de mettre en évidence des marqueurs de résistance ou de sensibilité, et enfin à terme peut-être remplacer la biopsie tumorale.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Des changements majeurs ont été effectués durant ces dix dernières années dans le traitement des patients atteints de cancers avancés: démonstration de l'efficacité de thérapies ciblées associées ou non à la chimiothérapie dans les cancers du poumon, du sein, du colon ou de la prostate (trastuzumab, imatinib, erlotinib, cetuximab, panitumumab, bevacizumab, regorafenib) ; identification des premiers biomarqueurs moléculaires permettant de sélectionner les patients qui répondront le mieux aux traitements ciblés (mutation *EGFR* ; *KRAS*, *translocation ALK*) ; intégration de ces nouvelles stratégies dans la prise en charge globale des patients du stade métastatique aux stades plus précoces. Ainsi, il est devenu essentiel de continuer à mieux comprendre le processus métastatique et son évolution chez nos patients, mais aussi d'identifier les mécanismes de résistance primaire et secondaire aux thérapies ciblées pour permettre d'affiner nos critères de sélection, mais aussi pour développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces. En parallèle, il est indispensable de développer des outils en pratique clinique qui permettront de suivre les modifications moléculaires de la maladie cancéreuse chez chaque patient. Dans cette optique, l'analyse de biomarqueurs circulants peu invasifs comme les CTC, les cellules endothéliales ou l'ADNcir est devenu un des enjeux majeurs de la recherche translationnelle.

Dans la première partie de mon travail, nous avons étudié l'intérêt de deux technologies (CellSearch® et ISET®) pour la détection des CTC chez des patients de cancer. Ce travail a montré que le nombre de CTC mesuré avec ces deux méthodes différentes étaient corrélé dans la majorité des cas chez les patients atteints de cancers du sein ou de la prostate, mais qu'il existe une

discordance importante entre le nombre de CTC détectées par le système CellSearch® et le système ISET®. Cette étude nous a permis de souligner la nécessité de comparer les différentes plateformes de détection des CTC, de mettre en évidence les avantages et les inconvénients de chaque technique et de proposer des perspectives pour les années à venir. Les perfectionnements technologiques de la plateforme CellSearch® et d'autres technologies (comme le système ISET®) dont l'utilisation est encore restreinte aux laboratoires de recherche, permettent des analyses complémentaires dans l'énumération des CTC, mais aussi dans la capture de populations différentes de CTC, et surtout de mettre en évidence différentes altérations moléculaires au niveau des CTC ouvrant la possibilité d'obtenir avec un simple prélèvement sanguin une véritable « biopsie tumorale liquide ». Ceci sera particulièrement important dans des pathologies tumorales dont les biopsies sont difficiles à obtenir de façon répétée comme les cancers du poumon ou les cancers de la prostate. Le cancer de la prostate est un des cancers les plus fréquents dans les pays occidentaux, une cause importante de décès par cancer chez les hommes en France, avec plus de 71000 nouveaux cas et plus de 10 000 décès par an (Guérin et al, 2010). Le décès par cancer de la prostate est dû à une dissémination métastatique et à l'acquisition d'une résistance à la suppression androgénique, définissant le stade de la résistance à la castration (CRPC). Les mécanismes moléculaires de la résistance à la castration ont été en partie élucidés ces dernières années, mais ont été difficile à étudier en partie par la difficulté d'obtenir du matériel tumoral chez les patients ayant des métastases. Ce dernier point a limité le développement de nouvelles thérapies (Attard et al, 2005), et la chimiothérapie comportant du docetaxel a été pendant longtemps le

seul traitement à avoir démontré un bénéfice en survie (Tannock et al 2004, Petrylak et al 2004, Fizazi et al 2007) depuis la castration décrite par Charles Huggins en 1941. Deux points importants permettent d'espérer un réel changement dans la prise en charge des patients. Premièrement, les 5 dernières années ont été marquées par au moins 6 stratégies thérapeutiques (cabazitaxel, abiraterone, MDV3100, denosumab, PROVENGE, radium 223) qui ont montré des résultats positifs dans de grandes études de phase III randomisées, ayant permis l'enregistrement de ces molécules et ainsi, une modification radicale de la prise en charge des patients ayant un CRPC métastatique. Ensuite, l'expérience clinique montre que le cancer de la prostate métastatique est une maladie hétérogène avec des évolutions des cancers de la prostate très variables (avec une survie médiane allant de moins de 1 an jusqu' à plus de 10 ans après progression sous castration), et une sensibilité au traitement différente. L'identification des altérations moléculaires oncogéniques dans les cancers de la prostate a permis d'initier un début de démantèlement moléculaire comme cela est fait dans les autres cancers les plus fréquents classés à partir de l'existence d'altérations moléculaires (comme ER, PR, HER2/neu et BRCA-1 dans les cancers du sein, EGFR dans les cancers du poumon et KRAS dans les cancers du colon), et a permis de développer des approches de thérapies ciblées dans les CRPC comme les nouvelles manipulations hormonales (abiraterone, MDV3100). Ainsi, à partir de ce premier travail sur l'analyse des CTC, nous avons mis en place un protocole prospectif qui a pour but de collecter les CTC de patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration avancé, de caractériser certaines anomalies moléculaires sur ces CTC, et de comparer le phénotype moléculaire

de ces CTC aux tissus tumoraux provenant de métastases et de la tumeur primitive. Ce protocole est en cours d'étude (protocole PETRUS, ANNEXE).

Compte tenu du nombre de nouvelles molécules en développement, la méthodologie des études de phase précoce est en plein bouleversement. Bien que la recherche des toxicités reste un des éléments majeurs d'évaluation d'une phase I, la mise en évidence de signaux d'activité antitumorale est devenu un point aussi important.

Dans la deuxième partie de mon travail, nous avons montré que des marqueurs circulants comme les CEC ou les CEP pourraient avoir un intérêt pour mieux appréhender le pronostic des patients atteints de cancers avancés inclus en phase 1. Les programmes de « sélection moléculaire » (MOSCATO, SAFIR, SHIVA, WINTHER) sont des exemples de protocoles qui ont pour but en particulier de permettre de proposer à des patients atteints de cancer avancé une étude approfondie des anomalies de leur cancer. Les développements technologiques des analyses à haut débit ont mis en évidence que chaque type de cancer (poumon, sein, prostate, colon gliome, etc) est en fait un ensemble regroupant nombreuses sous-classes moléculaires. A titre d'exemple, pour le cancer de la prostate les analyses par CGH (Comparative Genomic Hybridization) array ont démontré de façon répétée que de nombreuses altérations moléculaires existantes comme les amplification du récepteur aux androgènes, les délétions de *PTEN*, les translocations *TMPRSS2-ERG*. La situation est la même pour le cancer du poumon avec les gènes *EGFR*, *ALK*, *FGFR1*, *ERBB2*, mutés ou remaniés dans 2 à 10 % des cas. D'autres illustrations pourraient être fournies pour le cancer du sein

(amplification *HER2*, mutation *PIK3CA*) ; le mélanome (mutations *cKIT*, *B-Raf*), le colon (mutations *K-RAS*, *B-RAF*), les gliomes malins (amplification *PDGFR*) et d'autres tumeurs. Ainsi, ces données montrent qu'un nombre important d'anomalies moléculaires pourrait contribuer à l'oncogenèse et à la résistance aux traitements, et l'identification de ces anomalies chez un patient donné pourrait permettre un traitement efficace même dans le cadre d'essais précoces chez des patients résistants aux traitements conventionnels. Dans ce contexte, le développement des analyses des biopsies tumorales mais aussi en parallèle de biomarqueurs sanguins peu invasifs est indispensable si nous souhaitons proposer un suivi de l'évolution tumorale au cours du traitement.

Nos travaux illustrent l'intérêt majeur de l'interaction entre le monde de la biologie fondamentale de la cellule ou de la biologie moléculaire et celui de la clinique. Les connaissances de la biologie du processus métastatique ont permis de mieux comprendre l'histoire naturelle des cancers métastatique. En parallèle, l'identification des altérations moléculaires principales de la plupart des cancers ont ainsi permis le développement des premières générations de thérapies moléculaires ciblées (cetuximab, trastuzumab, erlotinib...) dans différents cancers. L'identification des mécanismes de résistance permettra de mieux sélectionner les patients pour chaque thérapeutique mais aussi d'imaginer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'étude de ces anomalies à partir de prélèvements peu invasifs comme le sang (CTC ou ADN circulant) pourrait permettre de proposer un suivi de ces altérations de façon simple et répétée dans le cadre du suivi des patients ayant un cancer avancé traités par TMC ou être utilisé pour une meilleure compréhension du processus

métastatique ou dans la cadre d'une évaluation des mécanisme de résistance à des TMC. Ainsi, l'analyse des CTC et d'autres éléments circulants pourrait permettre de mieux comprendre la biologie des cancers, de choisir une thérapie moléculaire adaptée, de guider le traitement et de suivre l'efficacité anti-tumorale, et devenir un élément capital dans les programmes de «médecine personnalisée».

REFERENCES

Ady N, Morat L, Fizazi K, Soria JC, Mathieu MC, Prapotnich D, Sabatier L, Chauveinc L. Detection of HER-2/neu-positive circulating epithelial cells in prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2004 Jan 26;90(2):443-8.

Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5013-21.

Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2012;63:199-215..

Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):110-8.

Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897-904.

Arkenau HT, Olmos D, Ang JE, Barriuso J, Karavasilis V, Ashley S, de Bono J, Judson I, Kaye S. 90-Days mortality rate in patients treated within the context of a phase-I trial: how should we identify patients who should not go on trial? *Eur J Cancer*. 2008 Jul;44(11):1536-40.(a)

Arkenau HT, Olmos D, Ang JE, de Bono J, Judson I, Kaye S Clinical outcome and prognosis factors for patients treated within the context of a phase I study: the Royal Marsden Hospital experience. *Br J Cancer*. 2008 Mar 25;98(6):1029-33. (b)

Arkenau HT, Barriuso J, Olmos D, Ang JE, de Bono J, Judson I, Kaye S. Prospective validation of a prognostic score to improve patient selection for oncology phase I trials. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 1;27(16):2692-6.

Arteaga CL, Baselga J. Impact of genomics on personalized cancer medicine. *Clin Cancer Res*. 2012 Feb 1;18(3):612-8.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):221-8.

Attard G, Sarker D, Reid A, Molife R, Parker C, de Bono JS. Improving the outcome of patients with castration-resistant prostate cancer through rational drug development. *Br J Cancer*. 2006 Oct 9;95(7):767-74.

Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, A'Hern R, Levink R, Coumans F, Moreira J, Riisnaes R, Oommen NB, Hawche G, Jameson C, Thompson E, Sipkema R, Carden CP, Parker C, Dearnaley D, Kaye SB, Cooper CS, Molina A, Cox ME, Terstappen LW, de Bono JS. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2009 Apr 1;69(7):2912-8.

Autebert J, Coudert B, Bidard FC, Pierga JY, Descroix S, Malaquin L, Viovy JL. Microfluidic: an innovative tool for efficient cell sorting. *Methods.* 2012 Jul;57(3):297-307.

– B –

Bachelot T, Ray-Coquard I, Catimel G, Ardiet C, Guastalla JP, Dumortier A, Chauvin F, Droz JP, Philip T, Clavel M. Multivariate analysis of prognostic factors for toxicity and survival for patients enrolled in phase I clinical trials. *Ann Oncol.* 2000 Feb;11(2):151-6.

Bacelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpff M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013 Jun;31(6):539-44.

Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3-4):673-87.

Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):835-45.

Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A, Poupon MF. A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev.* 2008 Mar;27(1):5-10.

Bidard FC, Ferrand FR, Huguet F, Hammel P, Louvet C, Malka D, Boige V, Ducreux M, Andre T, de Gramont A, Mariani P, Pierga JY. Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012 May;82(2):103-15.

Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabières C, Janni W, Messina C, Paoletti C, Müller V, Hayes DF, Piccart M, Pierga JY. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 Jun;32(1-2):179-88.

Bidard FC, Pierga JY, Soria JC, Thiery JP. Translating metastasis-related biomarkers to the clinic--progress and pitfalls. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Mar;10(3):169-79.

Bidard FC, Mathiot C, Degeorges A, Etienne-Grimaldi MC, Delva R, Pivot X, Veyret C, Bergougnoux L, de Cremoux P, Milano G, Pierga JY. Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. *Ann Oncol*. 2010 Sep; 21(9): 1765-71.

Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Sauße S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Jun 26.

Board RE, Williams VS, Knight L, Shaw J, Greystoke A, Ranson M, Dive C, Blackhall FH, Hughes A."Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer." *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug;1137:98-107.

Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, Little S, Ranson M, Dive C, Hughes A, Whitcombe D."Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA." *Clin Chem*. 2008 Apr;54(4):757-60.

Board RE, Ellison G, Orr MC, Kemsley KR, McWalter G, Blockley LY, Dearden SP, Morris C, Ranson M, Cantarini MV, Dive C, Hughes A. Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study." *Br J Cancer*. 2009 Nov 17;101(10):1724-30.

de Bono JS, Attard G, Adjei A, Pollak MN, Fong PC, Haluska P, Roberts L, Melvin C, Repollet M, Chianese D, Connely M, Terstappen LW, Gualberto A. Potential applications for circulating tumor cells expressing the insulin-like growth factor-I receptor. *Clin Cancer Res*. 2007 Jun 15;13(12):3611-6.

de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6302-9.

– C –

Carden CP, Sarker D, Postel-Vinay S, Yap TA, Attard G, Banerji U, Garrett MD, Thomas GV, Workman P, Kaye SB, de Bono JS. Can molecular biomarker-based patient selection in Phase I trials accelerate anticancer drug development? *Drug Discov Today*. 2010 Feb;15(3-4):88-97.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jun;6(6):315-26.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298-307.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):563-72.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.

Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008 Dec 25;359(26):2814-23

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 1;26(19):3213-21.

Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, de Bono JS, Terstappen LW. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*. 2010 Sep;21(9):1851-7.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781-91.

Cummings J, Ranson M, Lacasse E et al. Method validation and preliminary qualification of pharmacodynamic biomarkers employed to evaluate the clinical efficacy of an antisense compound (AEG35156) targeted to the X-linked inhibitor of apoptosis protein XIAP. *Br J Cancer* 2006; 95: 42–48.

Cummings J, Raynaud F, Jones L, Sugar R, Dive C. Fit-for-purpose biomarker method validation for application in clinical trials of anticancer drugs. *Br J Cancer*. 2010 Oct 26;103(9):1313-7.

– D –

Daugherty CK. Ethical issues in the development of new agents. *Invest New Drugs*. 1999;17(2):145-53.

Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1199-209.

De Giorgi U, Valero V, Rohren E, Dawood S, Ueno NT, Miller MC, Doyle GV, Jackson S, Andreopoulou E, Handy BC, Reuben JM, Fritsche HA, Macapinlac HA, Hortobagyi GN, Cristofanilli M. Circulating tumor cells and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for outcome prediction in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3303-11.

De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, Vivancos A, Tabernero J, Reis-Filho JS, Seoane J. Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Jul;10(7):377-89.

Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):537-40.

Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Nov 20;88(22):1652-8.

Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. "Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 8;102(45):16368-73.

Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*. 2006 Jul;3(7):551-9.

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):985-90.

– E –

Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):579-91.

Eschwège P, Dumas F, Blanchet P, Le Maire V, Benoit G, Jardin A, Lacour B, Loric S. Haematogenous dissemination of prostatic epithelial cells during radical prostatectomy. *Lancet*. 1995 Dec 9;346(8989):1528-30.

Farace F, Bidart JM. Circulating endothelial cells: biomarkers for monitoring activity of antiangiogenic therapy. *Bull Cancer*. 2007 Jul;94 Spec No:S254-9.

Farace F, Gross-Goupil M, Tournay E, Taylor M, Vimond N, Jacques N, Billiot F, Mauguen A, Hill C, Escudier B. Levels of circulating CD45(dim)CD34(+)VEGFR2(+) progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 2011;104:1144-1150.

Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, Laplanche A, Chauchereau A, Lacroix L, Planchard D, Le Moulec S, André F, Fizazi K, Soria JC, Vielh P. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer*. 2011 Sep 6;105(6):847-53.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002 Oct;2(10):795-803.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):10-4.

Ferté C, André F, Soria JC. Molecular circuits of solid tumors: prognostic and predictive tools for bedside use. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jul;7(7):367-80.

Ferte C, Fernandez M, Hollebecque A, Koscielny S, Levy A, Bahleda R, Massard C, Soria JC. Use of tumor growth rate (TGR) to provide useful clinical information in phase I trials and reveal clear drug-specific profiles. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 3010).

Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 1970 Oct;45(4):773-82.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453-8.

Fizazi K, Morat L, Chauveinc L, Prapotnich D, De Crevoisier R, Escudier B, Cathelineau X, Rozet F, Vallancien G, Sabatier L, Soria JC. High detection rate of circulating tumor cells in blood of patients with prostate cancer using telomerase activity. *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):518-21.

Fizazi K, Le Maitre A, Hudes G, Berry WR, Kelly WK, Eymard JC, Logothetis CJ, Pignon JP, Michiels S; Meta-analysis of Estramustine in Prostate Cancer (MECaP) Trialists' Collaborative Group. Addition of estramustine to chemotherapy and survival of patients with castration-refractory prostate cancer: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2007 Nov;8(11):994-1000.

Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, Kim SI, Choi HJ, Paik S, Pogue-Geile KL. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC Cancer*. 2010 Mar 16;10:101.

– G –

Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 May;62(5):931-9. doi: 10.1007/s00262-012-1387-1.

Gomez-Roca C, Koscielny S, Ribrag V, Dromain C, Marzouk I, Bidault F, Bahleda R, Ferte C, Massard C, Soria JC (2011) Tumour growth rates and RECIST criteria in early drug development. *Eur J Cancer*. 2011 Nov;47(17):2512-6.

Greystoke A, Dean E, Saunders MP, Cummings J, Hughes A, Ranson M, Dive C, Renehan AG. Multi-level evidence that circulating CK18 is a biomarker of tumour burden in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012 Oct 23;107(9):1518-24.

Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, Davis DW. ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*. 2012 Jun 27;6(2):24133.

– H –

Han C, Braybrooke JP, Deplanque G, Taylor M, Mackintosh D, Kaur K, Samouri K, Ganesan TS, Harris AL, Talbot DC. Comparison of prognostic factors in patients in phase I trials of cytotoxic drugs vs new noncytotoxic agents, *Br J Cancer*. 2003 Oct 6;89(7):1166-71.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L. Circulating tumor cells: Advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2013 Oct 14. pii: S0163-7258(13)00209-X.

Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, Blair B, Slater S, Powers P, Zorzi J, Jeter SC, Oliver GR, Fetting J, Emens L, Riley C, Stearns V, Diehl F, Angenendt P, Huang P, Cope L, Argani P, Murphy KM, Bachman KE, Greshock J, Wolff AC, Park BH. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3462-9.

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer* 2001; 95: 114–120.

Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA Jr. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Sep 16;101(18):1284-5.

Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Mourad N, Butori C, Selva E, Poudenx M, Sibon S, Kelhef S, Vénissac N, Jais JP, Mouroux J, Molina TJ, Hofman P. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res.* 2011 Feb 15;17(4):827-35.

Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, Vénissac N, Mouroux J, Vielh P, Hofman P. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer.* 2011 Oct 1;129(7):1651-60.

Horstmann E, McCabe MS, Grochow L, Yamamoto S, Rubinstein L, Budd T, Shoemaker D, Emanuel EJ, Grady C. Risks and benefits of phase 1 oncology trials, 1991 through 2002. *N Engl J Med* 2005;352:895–904.

Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, Cummings J, Ward T, Board R, Amir E, Hughes S, Krebs M, Hughes A, Ranson M, Lorigan P, Dive C, Blackhall FH. Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):808-16.

Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol.* 2011 Mar;178(3):989-96.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, Priest LJ, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall FH, Dive C. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012 Feb 10;30(5):525-32.

– | –

Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, Zahaf K, Marquette CH, Mouroux J, Paterlini-Bréchet P, Hofman P. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2012 Nov;23(11):2907-13.

Italiano A, Massard C, Bahleda R, Vataire AL, Deutsch E, Magné N, Pignon JP, Vassal G, Armand JP, Soria JC. Treatment outcome and survival in participants of phase 1 oncology trials carried out from 2003 to 2006 at Institute Gustave Roussy. *Ann Oncol*. 2008 Apr;19(4):787-92. Epub 2007 Nov 27.

– J –

Jacques N, Vimond N, Conforti R, Griscelli F, Lecluse Y, Laplanche A, Malka D, Vielh P, Farace F. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. *J Immunol Methods*. 2008 Sep 15;337(2):132-43.

Janisch L, Mick R, Schilsky RL, Vogelzang NJ, O'Brien S, Kut M, Ratain MJ. Prognostic factors for survival in patients treated in phase I clinical trials. *Cancer*. 1994 Oct 1;74(7):1965-73.

Joose SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):8-11.

Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:626-635.

– K –

Khoja L, Backen A, Sloane R, Menasce L, Ryder D, Krebs M, Board R, Clack G, Hughes A, Blackhall F, Valle JW, Dive C. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *Br J Cancer*. 2012 Jan 31;106(3):508-16.

Khoja L, Shenjere P, Hodgson C, Hodgetts J, Clack G, Hughes A, Lorigan P, Dive C
Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2013 Nov 6.

Kraan J, Sleijfer S, Stribos MH, Ignatiadis M, Peeters D, Pierga JY, Farace F, Riethdorf S, Fehm T, Zorzino L, Tibbe AG, Maestro M, Gisbert-Criado R, Denton G, de Bono JS, Dive C, Foekens JA, Gratama JW. External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch(®) system: a feasibility study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011 Mar;80(2):112-8.

Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Mauermann J, Steiner G, Marberger M, Bivén K, Shoshan MC, Linder S. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18.. *Cancer Res*. 2004 Mar 1;64(5):1751-6.

Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):172-87.

Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol*. 2010 Nov;2(6):351-65.

Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall FH. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1556-63.

Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, Ward TH, Backen A, Clack G, Hughes A, Ranson M, Blackhall FH, Dive C. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol*. 2012 Feb;7(2):306-15.

Kurzrock R, Benjamin RS. Risks and benefits of phase 1 oncology trials, revisited. *N Engl J Med*. 2005 Mar 3;352(9):930-2.

Kurzrock R, Stewart DJ. Compliance in early-phase cancer clinical trials research. *Oncologist*. 2013;18(3):308-13.

– L –

Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011 Jun 1;128(11):2527-35.

Leary RJ, Kinde I, Diehl F, Schmidt K, Clouser C, Duncan C, Antipova A, Lee C, McKernan K, De La Vega FM, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr, Velculescu VE. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing *Sci Transl Med*. 2010 Feb 24;2(20):20ra14.

Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2011 Oct 25;105(9):1338-41.

Leversha MA, Han J, Asgari Z, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Lilja H, Heller G, Fleisher M, Scher HI. Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15;15(6):2091-7.

Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods*. 2006 Feb;3(2):95-7.

Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep;57(9):1242-55.

Ligthart ST, Coumans FA, Attard G, Cassidy AM, de Bono JS, Terstappen LW. Unbiased and automated identification of a circulating tumour cell definition that associates with overall survival. *PLoS One*. 2011;6(11):e27419.

Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998 Apr;62(4):768-75.

Loric S, Dumas F, Eschwege P, Blanchet P, Benoit G, Jardin A, Lacour B. Enhanced detection of hematogenous circulating prostatic cells in patients with prostate adenocarcinoma by using nested reverse transcription polymerase chain reaction assay based on prostate-specific membrane antigen. *Clin Chem*. 1995 Dec;41(12 Pt 1):1698-704.

LoRusso PM, Anderson AB, Boerner SA, Averbuch SD. Making the investigational oncology pipeline more efficient and effective: are we headed in the right direction? *Clin Cancer Res*. 2010 Dec 15;16(24):5956-62.

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194-1201.

– M –

Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2009 Mar-Apr;59(2):111-37.

MacConaill LE, Campbell CD, Kehoe SM, Bass AJ, Hatton C, Niu L, Davis M, Yao K, Hanna M, Mondal C, Luongo L, Emery CM, Baker AC, Philips J, Goff DJ, Fiorentino M, Rubin MA, Polyak K, Chan J, Wang Y, Fletcher JA, Santagata S, Corso G, Roviello F, Shivdasani R, Kieran MW, Ligon KL, Stiles CD, Hahn WC, Meyerson ML, Garraway LA. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples. *PLoS One*. 2009 Nov 18;4(11):e7887.

Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW, Digumarthy S, Muzikansky A, Irimia D, Settleman J, Tompkins RG, Lynch TJ, Toner M, Haber DA. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008 Jul 24;359(4):366-77.

Malka D, Boige V, Jacques N, Vimond N, Adenis A, Boucher E, Pierga JY, Conroy T, Chauffert B, François E, Guichard P, Galais MP, Cvitkovic F, Ducreux M, Farace F. Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol*. 2012 Apr;23(4):919-27.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008 May 16;133(4):704-15.

Massard C, Borget I, Le Deley MC, Taylor M, Gomez-Roca C, Soria JC, Farace F. Prognostic value of circulating VEGFR2+ bone marrow-derived progenitor cells in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer*. 2012 Jun;48(9):1354-62.

Massard C, Fizazi K. Targeting continued androgen receptor signaling in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):3876-83.

Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):532-6.

Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med*. 2006 Mar;12(3):130-9.

Mordant P, Loriot Y, Lahon B, Castier Y, Lesèche G, Soria JC, Vozenin MC, Decraene C, Deutsch E. Bioluminescent orthotopic mouse models of human localized non-small cell lung cancer: feasibility and identification of circulating tumour cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e26073.

Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):584-93.

Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong AS, Marass F, Humphray S, Hadfield J, Bentley D, Chin TM, Brenton JD, Caldas C, Rosenfeld N. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):108-12.

– N –

Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007 Dec 20;450(7173):1235-9.

Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):274-84.

Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M, Gerald WL, Massagué J. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):51-62.

– O –

Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, Ledaki I, Attard G, Carden CP, Reid AH, A'Hern R, Fong PC, Oomen NB, Molife R, Dearnaley D, Parker C, Terstappen LW, de Bono JS. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol*. 2009 Jan;20(1):27-33.

Olmos D, Baird RD, Yap TA, Massard C, Pope L, Sandhu SK, Attard G, Dukes J, Papadatos-Pastos D, Grainger P, Kaye SB, de Bono JS. Baseline circulating tumor cell counts significantly enhance a prognostic score for patients participating in phase I oncology trials. *Clin Cancer Res*. 2011 Aug 1;17(15):5188-96.

Olmos D, A'Hern R, Marsoni S, Morales R, Gomez-Roca C, Verweij J, Voest EE, Schöffski P, AngJE, Penel N, Schellens JH, Del Conte G, Brunetto AT, Evans TR, Wilson R, Gallerani E, Plummer R, Tabernero J, Soria JC, Kaye SB (2012) Patient selection for oncology phase I trials – a multi-institutional study of prognostic factors. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 20;30(9):996-1004.

Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, Yu M, Chen PI, Morgan B, Trautwein J, Kimura A, Sengupta S, Stott SL, Karabacak NM, Barber TA, Walsh JR, Smith K, Spuhler PS, Sullivan JP, Lee RJ, Ting DT, Luo X, Shaw AT, Bardia A, Sequist LV, Louis DN, Maheswaran S, Kapur R, Haber DA, Toner M. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*. 2013 Apr 3;5(179):179ra47.

– P –

Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, Borget I, Planchard D, Taylor M, André F, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F. Detection of Circulating Tumor Cells Harboring a Unique ALK Rearrangement in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Jun 20;31(18):2273-81.

Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Häussinger K, Thetter O, Riethmüller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*. 1996 Mar 9;347(9002):649-53.

Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):448-56.

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):329-40.

Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jun;6(6):339-51.

Pantel K, Diaz LA Jr, Polyak K. Tracking tumor resistance using 'liquid biopsies'. *Nat Med*. 2013 Jun;19(6):676-7.

Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, Hayes DF, Kapke G, Kumar P, Lee JSh, Liu MC, McCormack R, Mikulski S, Nagahara L, Pantel K, Pearson-White S, Punnoose EA, Roadcap LT, Schade AE,

Scher HI, Sigman CC, Kelloff GJ. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*. 2012 Jul 2;10:138.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*. 2007 Aug 18;253(2):180-204.

Penel N, Vanseymortier M, Bonneterre ME, Clisant S, Dansin E, Vendel Y, Beuscart R, Bonneterre J. Prognostic factors among cancer patients with good performance status screened for phase I trials. *Invest New Drugs*. 2008 Feb;26(1):53-8.

Penel N, Delord JP, Bonneterre ME, Bachelot T, Ray-Coquard I, Blay JY, Pascal LB, Borel C, Filleron T, Adenis A, Bonneterre J. Development and validation of a model that predicts early death among cancer patients participating in phase 1 clinical trials investigating cytotoxics. *Invest New Drugs*. 2010 Feb;28(1):76-82.

Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, Massard C, Cassier PA, Miranda S, Clark J, Denholm KA, Thway K, Gonzalez De Castro D, Attard G, Molife LR, Kaye SB, Banerji U, de Bono JS. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One*. 2012;7(11):e47020.

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1513-2

Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Cancer. Circulating tumor cells. *Science*. 2013 Sep 13;341(6151):1186-8.

Ploquin A, Olmos D, Ferté C, Cassier PA, Kramar A, Duhamel A, Penel N. Life-expectancy of patients enrolled in phase 1 clinical trials: a systematic review of published prognostic models. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Aug;83(2):242-8.

Ploquin A, Olmos D, Lacombe D, A'Hern R, Duhamel A, Twelves C, Marsoni S, Morales-Barrera R, Soria JC, Verweij J, Voest EE, Schöffski P, Schellens JH, Kramar A, Kristeleit RS, Arkenau HT, Kaye SB, Penel N. Prediction of early death among patients enrolled in phase I trials: development and validation of a new model based on platelet count and albumin. *Br J Cancer*. 2012 Sep 25;107(7):1025-30.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):265-73.

– R –

Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):920-8

Riethdorf S, Müller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I, Hilfrich J, Holms F, Tesch H, Eidtmann H, Untch M, von Minckwitz G, Pantel K. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res*. 2010 May 1;16(9):2634-45.

Roberts TG Jr, Goulart BH, Squitieri L, Stallings SC, Halpern EF, Chabner BA, Gazelle GS, Finkelstein SN, Clark JW.. Trends in the risk and benefits to patients with cancer participating in phase 1 clinical trial. *JAMA* 2004;292:2130–40.

Rodón J, Saura C, Dienstmann R, Vivancos A, Ramón y Cajal S, Baselga J, Tabernero J. Molecular prescreening to select patient population in early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012 Apr 3;9(6):359-66.

Ronzoni M, Manzoni M, Mariucci S, Loupakis F, Brugnatelli S, Bencardino K, Rovati B, Tinelli C, Falcone A, Villa E, Danova M. Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as predictive markers of clinical response to bevacizumab-based first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2010 Dec;21(12):2382-9.

Rousselot P. Diagnosis and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Rev Prat*. 2005 Oct 15;55(15):1647-57.

Saliba AE, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard FC, Mathiot C, Pierga JY, Fraiser V, Salamero J, Saada V, Farace F, Vielh P, Malaquin L, Viovy JL. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14524-9.

Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak P, Doyle GV, Terstappen LW, Lilja H, Heller G, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2023-9.

Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol*. 2009 Mar;10(3):233-9.

Scher HI, Morris MJ, Larson S, Heller G. Validation and clinical utility of prostate cancer biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Apr;10(4):225-34.

Schwarzenbach H, Chun FK, Lange I, Carpenter S, Gottberg M, Erbersdobler A, Friedrich MG, Huland H, Pantel K. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1465-71.

Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug;1137:190-6.

Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, Pantel K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):1032-8.

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun;11(6):426-37.

Simkens LH, Tol J, Terstappen LW, Teerenstra S, Punt CJ, Nagtegaal ID. The predictive and prognostic value of circulating endothelial cells in advanced colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol*. 2010 Dec;21(12):2447-8.

Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, Boussin FD, Sabatier L. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1999 May;5(5):971-5.

Soria JC, Morat L, Durdux C, Housset M, Cortez A, Blaise R, Sabatier L. The molecular detection of circulating tumor cells in bladder cancer using telomerase activity. *J Urol*. 2002 Jan;167(1):352-6.

Stein WD, Wilkerson J, Kim ST, Huang X, Motzer RJ, Fojo AT, Bates SE. Analyzing the pivotal trial that compared sunitinib and IFN- α in renal cell carcinoma, using a method that assesses tumor regression and growth. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 15;18(8):2374-81.

Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, Inserra EJ, Ulman M, Springer S, Nakamura Z, Moore AL, Tsukrov DI, Kempner ME, Dahl DM, Wu CL, Iafrate AJ, Smith MR, Tompkins RG, Sequist LV, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31;2(25):25ra23.

Strijbos MH, Gratama JW, Schmitz PI, Rao C, Onstenk W, Doyle GV, Miller MC, de Wit R, Terstappen LW, Sleijfer S. Circulating endothelial cells, circulating tumour cells, tissue factor, endothelin-1 and overall survival in prostate cancer patients treated with docetaxel. *Eur J Cancer*. 2010 Jul;46(11):2027-35

– T –

Taly V, Pekin D, El Abed A, Laurent-Puig P. Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol Med*. 2012 Jul;18(7):405-16.

Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, Higashiyama M, Kodama K, Imamura F, Kato K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7808-15.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1502-12.

Taylor M, Rössler J, Georger B, Laplanche A, Hartmann O, Vassal G, Farace F. High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2009;15:4561-4571.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Dec;15(6):740-6.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90.

Thiery JP, Lim CT. Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell*. 2013 Mar 18;23(3):272-3.

Thompson EW, Haviv I. The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat Med.* 2011 Sep;17(9):1048-9.

Tursz T, Andre F, Lazar V, Lacroix L, Soria JC. Implications of personalized medicine--perspective from a cancer center. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Mar;8(3):177-83. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.222.

– U –

Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 2006 Jun;52(6):1062-9.

– V –

van der Vaart M, Semenov DV, Kuligina EV, Richter VA, Pretorius PJ. Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Clin Chim Acta.* 2009 Nov;409(1-2):21-7.

van Puijenbroek M, Dierssen JW, Stanssens P, van Eijk R, Cleton-Jansen AM, van Wezel T, Morreau H. Mass spectrometry-based loss of heterozygosity analysis of single-nucleotide polymorphism loci in paraffin embedded tumors using the MassEXTEND assay: single-nucleotide polymorphism loss of heterozygosity analysis of the protein tyrosine phosphatase receptor type J in familial colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2005 Nov;7(5):623-30.

– W, Y et Z –

Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science.* 2002 Jul 5;297(5578):63-4.

Wheler J, Tsimberidou AM, Hong D, Naing A, Jackson T, Liu S, Feng L, Kurzrock R (2009) Survival of patients in a Phase 1 clinic : the M.D. Anderson Cancer Center experience, *Cancer* 115(5):1091-9.

Yamamoto N, Tamura T, Fukuoka M, Saijo N. Survival and prognostic factors in lung cancer patients treated in phase I trials: Japanese experience. *Int J Oncol.* 1999 Oct;15(4):737-41.

Yap TA, Omlin A, de Bono JS. Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *J Clin Oncol.* 2013 Apr 20;31(12):1592-605.

Zach O, Lutz D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jan;18(1):48-56.

ANNEXES

Relationship between RECIST response and variation of Circulating Tumor Cells (CTC)
for patients enrolled in phase I trials.

Project Short Title:
CTC and RECIST in phase I trials.

INVESTIGATOR COORDONNATOR	Professor Jean-Charles SORIA Service d'Innovations Thérapeutiques Précoces (SITEP) Early clinical trial unit, Division of Cancer Medecine Gustave Roussy Institute 94805 Villejuif Cedex, France Tél. :+33 1 42 11 42 91 Fax : +33 1 42 11 52 17 Email : soria@igr.fr
--------------------------------------	---

STATISTICIANS	Doctor Marie-Cécile LE DELEY & Doctor Isabelle BORGET Biostatistic and Epidemiology Department Gustave Roussy Institute; Villejuif, France
----------------------	--

ABSTRACT

Circulating tumor cells are tumor cells release in blood stream, frequently found in blood of patient bearing metastatic cancers.

The CellSearch® system is a semi-automated fluorescent-based performing immunomagnetic cell with anti epithelial marker antibody (anti EpCAM) then labeling with anti-cytokeratins antibodies. This technology allows a robust and reproducible detection of few CTC (as few as 1 CTC in 7.5 ml of blood). Several recent studies have shown that CTC measurement provide prognostic information regarding progression free and overall survival in metastatic breast (Cristofanilli et al., 2004), colorectal (Cohen et al., 2008) and prostate cancer (de Bono et al., 2008) in large cohort of patients. The variation of CTCs in patients with metastatic cancer at baseline and after one cycle of treatment is associated to efficacy as determined by traditional imaging modalities (RECIST) at 2 month.

In addition, early clinical research allowing identification of active new drugs is a cornerstone for future therapeutic strategies in oncology. This first step of clinical research is mainly represented by phase I clinical trials. Evaluation of antitumor response is based on imaging according to RECIST criterions. Nevertheless several limits to the RECIST system are well admitted nowadays, notably for molecular targeted therapies.

Because CTC counting has been shown to be a marker independent of tumor type or treatment, it could constitute a new parameter to improve evaluation of tumor response to drugs in phase I clinical trials. Moreover Cellsearch® system appears robust and well standardized method allowing reproducible analysis in independent laboratories approved by FDA.

We hypothesized that variation of CTC counts occur before detectable variation in tumor size and we supposed that this parameter could be an earlier biological marker than variation of tumor size evaluate by imaging with the RECIST criterions.

In this project we propose to perform a prospective multicentric study with, as main objective, estimation of sensitivity and specificity of CTC increases (based on CTC counts at baseline and one month after) to predict progressive patients as defined by radiological examination performed at 2 month according to RECIST system. We will analyzed CTC in 200 patients bearing metastatic cancer and enrolled in phase I trials. According to RECIST evaluation and our previous experience (Italiano et al. 2008) we expect 100 patients to be "progressive" and 90 to be "not progressive" at 2 months leading to an estimation of specificity and sensibility with a 6.5% and 7.9% precision respectively.

If we conclude positively about concordance between CTC counting at one month and RECIST response ("progressive" versus "not progressive"), we will confirm the interest to investigate furthermore this biomarker, alone or combined (to classical or dynamic... imaging) to reach a more accurate evaluation of tumor response, than the one currently performed with RECIST parameters alone.



Code Promoteur de l'essai : CSET n°2012/1872

N° d'enregistrement : 2012-A00668-35

Titre abrégé du protocole : **PETRUS**

Version 1.0 du 02/07/2012

<p>PETRUS</p> <p>Vers un traitement personnalisé des cancers de la prostate métastatiques « précoces » basé sur l'utilisation de biomarqueurs évalués sur la tumeur ou les cellules tumorales circulantes</p> <p><u>P</u>rostate cancer <u>E</u>valuation of <u>Ta</u>Rgets in genito <u>U</u>rinary <u>S</u>creening program</p>
--

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	<p>Nom investigateur coordonnateur : Dr Christophe MASSARD Institut Gustave Roussy, 114 Rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Tél. : 0142 11 43 38 Fax : 01 42 11 43 39 Email : christophe.massard@igr.fr</p>
--	--

PROMOTEUR	<p>Institut Gustave Roussy Institut Gustave Roussy, 114 Rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif</p>	<p>Signature du Directeur de la Direction de Recherche Clinique:</p> <p>Date :</p>
------------------	---	---

SYNOPSIS

N° d'enregistrement : 2012-A00668-35		Version 1.0 du 02/07/2012
Titre de l'essai	Vers un traitement personnalisé des cancers de la prostate métastatiques « précoces » basé sur l'utilisation de biomarqueurs évalués sur la tumeur ou les cellules tumorales circulantes	
Titre abrégé	PETRUS	
Investigateur-Coordonnateur	DR C Massard, Institut Gustave Roussy	
Nombre de centres	5	
Promoteur	Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex France	
Type d'étude	Etude prospective évaluant l'apport des analyses moléculaires des cellules tumorales circulantes dans les cancers de la prostate	
Indication	Cancer métastatique de la prostate résistant à la castration	
Objectifs	<p>L'objectif principal de cette étude est de démontrer la faisabilité de mesurer de façon prospective des biomarqueurs dans le tissu tumoral et les CTC dans une grande cohorte de patients atteints de cancer de la prostate métastatique précoce suivis dans des centres d'Ile-de-France et d'utiliser ces biomarqueurs pour décider du meilleur traitement avec un objectif d'individualisation thérapeutique.</p> <p>Les objectifs secondaires sont d'évaluer les potentiels biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des traitements, de comparer les différentes techniques d'isolation des CTC, et de comparer les biomarqueurs dans le tissu tumoral et les CTC.</p>	
Critères de jugement	<p>Principal : Le succès est défini par la réalisation d'au moins une analyse moléculaire interprétable sur la biopsie de la prostate et/ou de la métastase ET sur le prélèvement des CTC</p> <p>Secondaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation de potentiels biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des traitements dans le tissu tumoral et/ou les CTC; - La comparaison des caractéristiques moléculaires des CTC à celles présentes dans le tissu tumoral de la tumeur primitive ou des métastases; - La comparaison de différentes techniques d'isolation des CTC comme la technique de filtration (Metagenex) ou la technique de séparation (Veridex CellTracks® System) pour leurs capacités à obtenir une caractérisation moléculaire des CTC par hybridation in situ (FISH), immunohistochimie (IHC) et séquençage. - Cette étude permettra également l'obtention d'informations quant aux limites et difficultés potentielles de cette approche en pratique clinique. 	
Schéma d'étude	Etude PROSPECTIVE	
Effectif prévu	Il est prévu 120 patients	

Critères d'inclusion	<p>Hommes ayant un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration : présence de métastases, progressant après une castration (testostéronémie < 0,50ng/ml)</p> <p>Patient débutant un nouveau traitement</p> <p>Métastases qui peuvent être biopsiées</p> <p>Age ≥ 18 ans</p> <p>PS 0/1/2</p> <p>Pas de limite dans le nombre de lignes de traitement</p>
Critères d'exclusion	<p>Espérance de vie <3 mois.</p> <p>Métastases cérébrales symptomatiques ou progressives en radiologie.</p> <p>Anomalie de la coagulation contre-indiquant la réalisation d'une biopsie.</p> <p>Patient ayant un cancer de la prostate d'emblée métastatique sans traitement</p> <p>Refus de signer le consentement éclairé.</p>
Procédures de l'essai	<p>Après avoir signé le consentement éclairé, les échantillons tumoraux seront obtenus à partir de :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biopsie initiale du cancer de la prostate (ou pièce de prostatectomie si disponible); - Biopsie d'un site métastatique après avoir recueilli le consentement spécifique du patient ; - Evaluation du compte de CTC et isolement des CTC pour permettre une caractérisation moléculaire des CTC obtenues avant traitement, à 1 mois après le début du traitement et après progression - Une biopsie tumorale optionnelle sera proposée au moment de la progression tumorale <p>Tous les tissus tumoraux collectés seront centralisés à l'Institut Gustave Roussy (Unité INSERM U981). Ces échantillons seront revus par un pathologiste.</p> <p>Lors des visites de suivi (V1, V2, V3 et VX) prévues tous les 2 mois et pendant les 6 premiers mois du suivi, 30mL de sang seront prélevés ainsi qu'à la progression. Le prélèvement initial se fera en absence de traitement.</p>
Etudes associées	<p>Pas d'études associées. Un biobanking sera effectué en l'absence d'opposition des patients. Un prélèvement sanguin (optionnel) de 40ml sera prélevé avant le début des traitements</p>
Durée de l'étude	<p>3 ans (2 ans de recrutement et 1 an de suivi)</p>

UNIVERSITE PARIS-SUD
ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE
Laboratoire INSERM U981

THÈSE DE DOCTORAT
Christophe MASSARD

BIOMARQUEURS CELLULAIRES CIRCULANTS DANS LES CANCERS AVANCES

Les biomarqueurs sanguins peuvent être utilisés pour définir le pronostic des patients ou permettre de déterminer les altérations moléculaires des cancers, et peut-être pouvoir guider les traitements de thérapies ciblées.

Les cellules tumorales circulantes sont le reflet de la cascade métastatique et de la progression tumorale. La détection et la caractérisation des CTC est un domaine clé de la recherche dans le cancer. Cependant, il n'existe pas de méthode standard pour la détection des CTC, et le premier objectif de notre étude a été de comparer deux systèmes de détection des CTC basé sur l'expression de l'antigène EpCAM (CellSearch), ou la taille des cellules (ISET). Nos résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation pour la détection des CTC dans les cancers du sein ou de la prostate, mais pas dans les cancers bronchiques. Ces résultats suggèrent qu'il est nécessaire de développer d'autres techniques de détection des CTC pour l'énumération et la caractérisation pour permettre une médecine de précision.

A ce jour il n'existe aucun marqueur validé pour prédire l'efficacité des antiangiogéniques. Les CEC et CEP sont des marqueurs prometteurs. Dans notre étude, nous avons fait l'hypothèse que les CEC et les CEP pouvaient être pronostic de la survie des patients inclus dans les études de phases précoces. Nos résultats montrent qu'un taux élevé de CEP est associé à un mauvais pronostic, et que les CEP pourraient permettre de mieux sélectionner les patients.

En conclusion, les marqueurs sanguins comme les CTC, les CEC ou les CEP peuvent être utilisés comme des facteurs pronostiques ou permettre une caractérisation moléculaire, et être une partie intégrante des programmes de médecine de précision.

Keys words: cancer ; biomarqueur; sang ; cellules tumorales circulantes; cellules endothéliales circulantes; thérapies moléculaires ciblées ; médecine de précision

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE

Laboratoire INSERM U981

THÈSE DE DOCTORAT

Christophe MASSARD

Non-invasive biomarkers detected in the blood could be use for risk stratification or molecular classification in advanced cancer patients, and could be a guide for molecular targeted therapies.

Circulating tumor cells reflect the metastatic cascade and the cancer progression. The detection and molecular characterization of circulating tumor cells (CTC) are a key area of translational cancer research. However, there is no universal method to detect CTC, and the primary objective of our study was to compare CTC detection systems based on the expression of the EpCAM antigen (CellSearch assay) or on cell size (ISET assay). Our results showed concordant results in CTC detection in breast and prostate cancer patients, but not in lung cancer patients. These results suggest that we need to develop other CTC detection techniques for enumeration and characterization in order to contribute to guiding specific targeted.

To date, no biomarker has been validated for the prediction of efficacy of antiangiogenic agents in patients with advanced cancer. CEC and CEP counts have recently emerged as a potential candidate. In our study, we hypothesised that CEC and CEP are prognostic markers in patients enrolled in phase I. Our results showed that high CEP levels are associated with poor prognostic and could provide a new tool for patient selection in early anticancer drug trials.

In conclusion, non invasive biomarkers such as CTC or CEC, CEP detectable in the blood could be used in the clinic as prognostic factors or surrogates for traditional tumor biopsies, and be a major component of precision medicine.

Keys words: cancer ; biomarker ; blood ; circulating tumor cells ; circulating endothelial cells ; molecular targeted therapies ; precision medicine